

**Einfluß von alpha-Ketoglutarat auf den
Ammoniakstoffwechsel von normalen und
chronisch urämischen Rattenlebern
nach akuter Ammoniakbelastung.**

Ludwig Löffler

1478



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der II. Medizinischen Klinik
der Universität München
Kom. Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Karl

Einfluß von alpha-Ketoglutarat auf den Ammoniak-
stoffwechsel von normalen und chronisch urämischen
Rattenlebern nach akuter Ammoniakbelastung.

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.



vorgelegt

von

Ludwig Löffler
Puppling 1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. J. Grunst

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H.-J. Karl

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1978



Meiner Mutter in Dankbarkeit

<u>Inhaltsverzeichnis.</u>	Seite
1. Einleitung.	1
2. Methode und Material.	4
2.1. Tiermaterial.	
2.1.1. Nephrektomie.	
2.1.2. Scheinoperation.	5
2.2. Hämoglobinfreie Leberperfusion im rezirkulierenden System.	
2.2.1. Perfusionsapparatur.	
2.2.2. Perfusionslösung.	6
2.2.3. Operationstechnik.	
2.3. Sauerstoffmessung.	7
2.4. Metabolitbestimmung aus dem Perfusat.	8
2.4.1. Extrakterstellung.	
2.4.2. Metabolitanalysen.	
2.4.2.1. Der optisch enzymatische Test nach Warburg.	
2.4.2.2. Zusammensetzung der einzelnen Tests.	9
3. Ergebnisse.	12
3.1. Ergebnisse unter Standardbedingungen.	
3.2. Ergebnisse unter zusätzlichem Ammoniakangebot (1,5 mM).	13
3.2.1. Ammoniakabbau.	
3.2.2. Harnstoffbildung.	15
3.2.3. Glutamatbildung.	
3.2.4. Glutaminbildung.	16
3.2.5. Alaninbildung.	17

	Seite
3.2.6. Sauerstoffaufnahmen.	
3.2.7. Redoxaequivalente.	19
3.2.7.1. Lactat/Pyruvat Quotient.	
3.2.7.2. β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat Quotient.	
3.3. Ergebnisse unter von 1,5 mM NH_4Cl und 0,3 mM α -KG.	20
3.3.1. Ammoniakabbau.	
3.3.2. Harnstoffbildung.	23
3.3.3. Glutamatbildung.	
3.3.4. Glutaminbildung.	26
3.3.5. Alaninbildung.	
3.3.6. α -Ketoglutaratabbau.	27
3.3.7. Sauerstoffaufnahme.	28
3.3.8. Redoxaequivalente.	30
3.3.8.1. Lactat/Pyruvat Quotient.	
3.3.8.2. β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat Quotient.	
4. Diskussion.	31
4.1. Mögliche Ursachen für den gestörten Stickstoffmetabolismus in der Urämie.	33
4.2. Die Umstellung des Stickstoffmetabolismus in der chronischen Urämie.	37
4.3. Einfluß von α -Ketoglutarat auf die Ammoniakelimination bei normalen Rattenlebern.	39
4.3.1. Harnstoffbildung.	
4.3.2. Glutaminbildung.	40
4.3.3. Alaninbildung.	
4.3.4. Redoxveränderungen.	41
4.4. Der α -Ketoglutarateinfluß auf den Stickstoffmetabolismus bei urämischen Rattenlebern.	42
4.4.1. Die Ammoniakelimination und die Harnstoffsynthese.	

	Seite
4.4.2. Glutamat- und Glutaminbildung.	
4.4.3. Redoxaequivalente.	43
4.4.4. Alaninbildung.	44
4.4.5. Die Bedeutung der Stoffwechselper- änderungen in der chronisch urämi- schen Leber bei alpha-KG Gabe.	45
5. Zusammenfassung.	49
6. Anhang: Tabellarium.	
7. Literaturverzeichnis.	

Einleitung:

Eine zentrale und quantitativ bedeutsame Rolle zur Beseitigung überflüssigen Stickstoffs im Organismus der Säugetiere nimmt die Harnstoffsynthese im Krebs-Henseleitzzyklus ein. Hierbei wird aus zwei Mol Ammoniak unter großem Energieaufwand ein Mol Harnstoff synthetisiert, der dann über die Nieren ausgeschieden werden kann. Auf diese Weise kann die Leber eines erwachsenen Menschen bis zu 30g Harnstoff in 24 Stunden produzieren, was circa 90% des in dieser Zeit über die Nieren ausgeschiedenen Stickstoffs entspricht. Die Kapazität dieses Stoffwechselweges ist so groß, daß bei Verdreifachung des Eiweißangebots in der Kost der anfallende Stickstoff problemlos gebunden werden kann (42,50). Dies macht verständlich, daß unter physiologischen Bedingungen das Auftreten einer Hyperammoniämie so gut wie ausgeschlossen ist. Andererseits muß aber mit einer Anhäufung des Ammoniaks im Blut gerechnet werden, wenn der Prozess der Harnstoffbildung in irgendeiner Form gestört ist. Dies belegen zahlreiche klinische Beobachtungen, wie z.B. die verschiedensten Formen der akuten oder chronischen Leberinsuffizienz (6,41,43,44,61) oder angeborene Enzymdefekte des Harnstoffzyklus (42,64,84) wie der Mangel an Ornithin-carbamyl-transferase. So fanden Hsia (42), Palmer (64) und auch Stein (84) regelmäßig bei Patienten mit angeborenen Enzymdefekten des Harnstoffzyklus eine deutliche Hyperammoniämie, außerdem eine Neigung zu cerebralen Krampfanfällen, die sich unter eiweißreicher Kost verstärkte. Neben der erhöhten Ammoniakkonzentration ließen sich in diesen Fällen auch Nebenprodukte des Harnstoffzyklus vermehrt im Blut nachweisen, so z.B. Guanidinbernsteinsäure, Orotsäure und andere Pyrimidinabkömmlinge (42,59), denen eine gewisse Toxizität zugeschrieben wird (11,14,15,84). Auch der Zustand der chronischen Urämie kann nach neueren Untersuchungen (14,31) als Beispiel für eine gestörte Harnstoffsynthese angesehen werden, denn bei ihr lassen sich sowohl erhöhte Ammoniakkonzentrationen im portalen Blut (31) auch als Nebenprodukte des Harnstoffzyklus

im systemischen Blut (14) nachweisen. Allerdings kann für die erhöhte Ammoniakkonzentration im Pfortaderblut (bei den Urämikern) eine vermehrte bakterielle Zersetzung des in den Darm zurückflutenden Harnstoffs zu Ammoniak verantwortlich gemacht werden, der dann wieder ins Blut zurückresorbiert und der Leber zugeleitet wird. Dieses Ammoniakangebot übersteigt aber die Harnstoffsynthesekapazität der urämischen Leber, wofür spricht, daß in zahlreichen Fällen auch im venösen Blut erhöhte Ammoniakwerte gefunden wurden (17). Außerdem werden gerade im Zustand der chronischen Urämie Stickstoffverbindungen wie Guanidinbernsteinsäure vermehrt in Urin und Blut der Betroffenen gefunden, besonders dann, wenn der Zeitabstand zu der letzten Dialyse besonders groß war (14,20,84). Als mögliche Erklärung wurden verminderte Enzymaktivitäten der sogenannten Schlüsselenzymen des Krebs-Henseleit-Zyklus angesehen (29,68). Das gilt wahrscheinlich nur für die chronische Urämie, denn in der akuten Urämie konnte eher eine Steigerung der Enzymaktivitäten beobachtet werden (88,56), (Hsia 42). Als mögliche Ursachen der eingeschränkten Harnstoffsynthese in der Urämie werden darüberhinaus Veränderungen im Intermediärstoffwechsel angenommen. So beobachtete Galloway (22) erhöhte Pyruvat- und Citratwerte, während Renner vor allem erhöhte alpha-KG- und Pyruvatkonzentrationen messen konnte. Eine wichtige Rolle spielt sicherlich die gestörte Energiebereitstellung durch eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung in der Atmungskette (20,22,29), da ja für die Synthese von einem Mol Harnstoff vier Mol ATP notwendig sind. In den Fällen mangelnder Energiebereitstellung macht vor allem die Leber auch von anderen Möglichkeiten der Stickstoffelimination Gebrauch. So wird der Stickstoff in Form der Aminogruppe in Aminosäuren oder deren Amide eingebaut. Als Beispiel dafür können erhöhte Glutaminspiegel im Liquor und im Blut chronisch urämischer Patienten (1,39,46) gelten. Ähnliche Veränderungen findet man auch bei Patienten mit angeborenen Defekten der Harnstoffsynthesenzyme (42).

Im Gegensatz zu der chronischen Stickstoffintoxikation fin-

det man nach einer akuten Ammoniakbelastung im Tierexperiment sowohl einen Abfall der Pyruvat- als auch alpha-Ketoglutaratkonzentrationen im Lebergewebe, die u.a. durch eine beschleunigte Verwertung beider Substrate erklärt werden (31,79). Als Ursache für diesen Effekt kommen eventuell erhöhte Enzymaktivitäten in Frage (Wieland 91).

Die vorliegende Arbeit, die über Untersuchungen am Modell der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber nach Scholz (76) berichtet, hat sich mit folgender Fragestellung beschäftigt:

1. Inwieweit ist der Stickstoffmetabolismus bei Lebern chronisch urämischer Ratten im Vergleich zu normalen Ratten unterschieden. Diese Untersuchungen wurden mit und ohne eine akute Ammoniakbelastung durchgeführt. Hierbei interessierte neben der Geschwindigkeit der Ammoniakelimination die Geschwindigkeit der Harnstoffbildung sowie der Bildung der Aminosäuren Glutamat, Glutamin und Alanin. Darüberhinaus wurde der Energieverbrauch an Hand der Sauerstoffaufnahme der Leber kalkuliert und Änderungen der Redoxpotentiale an Hand der Bestimmung der Lactat/Pyruvat und β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat Quotienten berechnet.

2. In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde der Einfluß einer zusätzlichen Gabe von alpha-Ketoglutarat auf den Stickstoffmetabolismus untersucht. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls im rezirkulierenden System der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber durchgeführt.

Die klinische Bedeutung dieser Studie liegt u.a. darin, daß in neuerer Zeit bei der Behandlung der Harnvergiftung in der Urämie dem Organismus zur Beseitigung des überschüssigen Stickstoffs Ketoanaloge von Aminosäuren angeboten werden, um auf diese Weise den überschüssigen Ammoniak zu binden und somit den Grad der Vergiftung zu mindern (2,25,26,27,53,63,70,71,83).

2. Methode und Material.

2.1. Tiermaterial.

Als Versuchstiere wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 150 - 180 g verwendet. Die Tiere wurden mit Altrumin Standardnahrung und Wasser ad libitum ernährt. Der Umstand der chronischen Urämie wurde mittels einer zweiseitigen 5/6 Nephrektomie erzeugt; als Kontrollen dienten scheinoperierte Tiere.

2.1.1. 5/6-Nephrektomie (modifiziert nach Morrison).

Morrison (60) beschrieb erstmals im Jahre 1966 die 5/6 Nephrektomie als eine geeignete Methode zur Erzeugung einer chronischen Urämie. Diese Methode wurde im wesentlichen von uns übernommen und nur insofern von uns modifiziert, daß nicht von ventral, sondern von dorsal der Zugang zu den Nieren gewählt wurde. Der Vorteil dieser Änderung ist, daß dabei das Peritoneum nicht eröffnet werden muß und somit auch das mögliche Infektionsrisiko verringert wird. Mittels eines Längsschnittes paravertebral wird der Retroperitonealraum eröffnet und die linke Niere an ihrer Kapsel an die Oberfläche gezogen. Die Kapsel wird stumpf gespalten und unter Schonung der Nebenniere entfernt. An der freiliegenden Niere werden beide Pole mit einer Schere abgetrennt, ohne jeweils das Nierenbeckenkelchsystem mit zu verletzen. Bei dieser Technik kommt es zu keinen nennenswerten Blutverlusten. Nach Polkappung wird die Restniere in den Situs zurückverlagert und die Wunde einschichtig mit durchgehenden Einzelknopfnähten verschlossen. In einer zweiten Sitzung, die ca. 7 Tage nach der Erstoperation erfolgte wird nach dem gleichen Verfahren die rechte Niere freipräpariert und total entfernt, wobei der Ureter und die versorgenden Gefäße ligiert und durchtrennt werden. Auch hierbei wird darauf geachtet, die Blutversorgung der Nebenniere nicht zu unterbinden. Die so behandelten Tiere erreichten unter der Standardkost und einer Wasserzufuhr ad libitum im Mit-

tel nach 6 Wochen den von uns erwünschten Grad der chronischen Urämie. Die Harnstoff- Stickstoffkonzentrationen lagen im Mittel zwischen 60 und 120 mg% (10 - 20 mM).

2.1.2. Die Scheinoperation.

Bei den scheinoperierten Ratten wurde der Retroperitonealraum auf die gleiche Weise eröffnet und die Nierenkapsel gespalten. Das Nierengewebe wurde bei diesen Verfahren nicht beeinträchtigt. Ansonsten wurde die Scheinoperation unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt.

2.2. Die hämoglobinfreie Perfusion im rezirkulierenden System.

Bei diesen Versuchen wurde die von Scholz und Bücher (74) im Jahre 1965 erstmals beschriebene Methode der hämoglobinfreien Leberperfusion verwendet. Die Perfusion wurde im rezirkulierenden System durchgeführt.

2.2.1. Die Perfusionsapparatur (75).

Die Perfusionsapparatur setzt sich zusammen aus einem temperierbaren Scheibenoxxygenator, einer Rollenpumpe sowie aus einem gefertigtem Plexiglasblock, der neben der Leber auch die Platinelektrode zur Sauerstoffmessung und eine Bohrung zur Probenentnahme enthält. Der Scheibenoxxygenator hat eine Länge von 30 cm und eine Breite von 9 cm und besteht aus einer rotierenden Kunststoffwalze aus Teflon mit ca 40 ausgefrästen Scheiben. Die gesamte benetzbare Oberfläche beträgt rund 2000 cm². Bei 120 Umdrehungen pro Minute wird die den Oxygenator durchströmende Perfusionslösung auf einer Fläche von 20 m² ausgebreitet. Das Gesamtvolumen der Perfusionslösung betrug 100 ml. Der Oxygenator wird von einem temperierten Wassermantel umgeben. Die Temperaturregulation ist so geschaltet, daß das in die Leber einströmende Perfusionsmedium eine konstante Temperatur von 36°C hat. Zur Verhinderung größerer Wärmeverluste sind alle Schlauchverbindungen zusätzlich isoliert. Um eine ausreichende

Durchströmung auch des peripheren Lebergewebes zu erhalten, wird im venösen Schenkel des Perfusionssystems ein Rückstau von etwa 3 - 5 cm H_2O erzeugt. Die Folge ist ein Anschwellen des Lebergewebes auf ca das 1,5 - 1,8 fache. Bei dieser Anordnung kann ein Teil des Perfusats über die Oberfläche der Leber abfließen, was zusätzlich das Austrocknen des Gewebes verhindert. Mit Hilfe einer 3 - 5 minütigen Vorperfusion können Erythrozyten und Barbiturat Spuren von der Narkose ausgewaschen werden. Hierbei wird Medium aus einem im Nebenschluß befindlichen Gefäßsystem verwendet. Die Vorperfusion wird im offenen System durchgeführt.

2.2.2. Die Perfusionslösung.

Die Perfusionslösung im geschlossenen System besteht aus einer Elektrolytlösung und Rinderalbumin (Fraktion V, Fa. Sigma, U.S.A.). Die Elektrolytlösung wurde erstmals 1932 von Krebs und Henseleit (51) beschrieben und ist aus folgenden Substanzen zusammengesetzt:

NaCl	115 mM	MgCl	1,18 mM
NaHCO ₃	25 mM	NaH ₂ PO ₄	1,24 mM
KCl	5,9 mM	CaCl ₂	2,50 mM
Na ₂ SO ₄	1,2 mM		

Zur Wahrung des onkotischen Drucks sind der Lösung 4 g Rinderalbumin pro 100 ml beigesetzt. Um etwaige Verunreinigungen in Form von Aminosäuren und kurzkettigen Peptiden aus der Eiweißlösung zu entfernen, wurde eine 48 stündige Dialyse vorgeschaltet. Die Perfusionslösung wird im Oxygenator mit einem wasserdampfgesättigten 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxydgemisch aufgesättigt. Bei dem verwendeten Bikarbonatpuffer (25 mM NaHCO₃, 5 Vol % CO₂) kann ein pH von 7,4 über einen längeren Zeitraum eingestellt werden.

2.2.3. Die Operationstechnik.

Die Tiere werden mit 5 mg/kg Nembutal intraperitoneal narkotisiert. Dann wird der Magen nach Eröffnen des Abdomens freipariert und vom Ösophagus abgetrennt. Die Perfusion der Leber erfolgt über die Pfortader, wobei bei intaktem Kreislauf eine

Polyäthylenkanüle in die Pfortader eingebracht und befestigt wird. Zur Verhinderung eines Abflusses über die untere Hohlvene wird die vena cava oberhalb des Abgangs der Nierenvenen ligiert. Bei diesem Vorgehen wird die Leber innerhalb von wenigen Sekunden homogen von Blut ausgewaschen und erreicht ihre gelbbraune Eigenfärbung. Nach Eröffnen des Thorax wird über das rechte Herzohr die abführende Kanüle in die Lebervene vorgeschoben und ebenfalls fixiert. Ein etwaiger Aufstau löst sich spätestens bis zu diesem Zeitpunkt. Nach der Vorperfusion mit 10 ml/min wird unmittelbar auf die Hauptperfusion umgeschaltet. Die Perfusionsgeschwindigkeit beträgt ca 25 - 30 ml/min ($= 3 - 4 \text{ ml/min/g Leber}$). Von der operationsbedingten Hypoxie erholt sich die Leber in der Regel innerhalb von wenigen Minuten.

2.3. Die Sauerstoffmessung.

Der im Perfusat gelöste Sauerstoff wird amperometrisch mit einer Platinelektrode, die im venösen Schenkel des Perfusionsystems eingebaut ist, kontinuierlich gemessen und mit einem angeschlossenen Schreiber registriert. Die verwendete Platinelektrode ist eine Modifizierung der von Clark (12) im Jahre 1953 erstmals beschriebenen Meßanordnung. Die Elektrode besteht aus einer Platinkathode und einer Ag/AgCl Anode, die durch eine KCl Lösung verbunden ist; sie ist vom Perfusionsmedium durch eine gasdurchlässige Teflonmembran getrennt. Durch die angelegte Spannung kommt es an der Platinoberfläche zu einer Sauerstoffreduktion. Der Reduktionsstrom ist bei einer Polarisationsspannung von 0,7 Volt der Sauerstoffspannung proportional. Vor jedem Versuch wird die Elektrode neu mit Teflon beschichtet und mit der Perfusionslösung geeicht, wobei der arterielle Sauerstoffdruck einer Sättigung mit reinem Sauerstoff entspricht, während der Nullpunkt durch eine Sättigung mit reinem Stickstoff festgelegt wird. Die Atmungsgröße ist bei konstanter Durchflußgeschwindigkeit proportional der Differenz der Sauerstoffdrucke vor und hinter der Leber. Der Sauerstoffverbrauch errechnet sich aus der O_2

Differenz (AVD), der Durchströmungsgeschwindigkeit und des Leberfeuchtgewichts nach folgender Formel:

$$\text{Atmungsgröße} = \frac{\text{AVD} \times a \times 2 \times D}{760 \times M \times \text{FG}} = \text{ug Atom O/Std/g}$$

a = Bunsenscher Absorptionskoeffizient = 0,023 ml O₂
gelöst in 1 ml 0,9% NaCl bei 760 Torr, 37° C

M = Molvolumen = 25,5 x 10³ ml, 37° C

FG = Feuchtgewicht der Leber in Gramm

D = Durchströmungsgeschwindigkeit (ml/min)

2.4. Metabolitbestimmung aus dem Perfusat.

2.4.1. Extrakterstellung.

Zu genau festgelegten Zeiten wurde 1 ml Perfusionslösung aus dem Sammelgefäß hinter der Leber entnommen und in ein eisgekühltes mit 0,6 ml 2n Perchlorsäure gefülltes Gefäß gegeben. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation wurde der Überstand mit 1,65M K₂CO₃ auf den pH von 7,6 neutralisiert.

2.4.2. Metabolitanalysen.

2.4.2.1. Der optisch-enzymatische Test nach Warburg (90).

Die Grundlage des enzymatischen Tests nach Warburg ist eine unterschiedliche Lichtabsorption des an der Reaktion teilnehmenden Coenzyms im oxygenierten bzw. reduzierten Zustand. So hat Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADH bzw. NADPH) ein Absorptionsmaximum bei 366 nm, während die oxygenierte Form Licht von dieser Wellenlänge nur in sehr geringen Maße absorbiert. An Hand der Abnahme bzw. Zunahme der Extinktion kann der Verbrauch bzw. die Zunahme von NADH im Meßansatz berechnet und somit auf die Menge des umgesetzten Substrats geschlossen werden. Die Substratbestimmungen sind jeweils Endwertbestimmungen.

2.4.2.2. Die Zusammensetzung der einzelnen Tests.

Die Testansätze lehnen sich an die von Hohorst (40), Williamson (93) und Geerken (23) angegebenen Methoden an. Es wurden im Einzelnen Modifikationen vorgenommen (3).

Ammoniak und Harnstoff:

Die Ammoniakbestimmung in der Perfusionslösung erfolgte nach der von Kirsten et al. (48) beschriebenen Methode mit Glutamatdehydrogenase.

Puffer: 1000 μ l 66 mM TRIS, pH 8,0
+ 100 μ l Extrakt
+ 1,5 mM alpha-Ketoglutarat
+ 0,5 mM ADP
+ 0,3 mM NADH
+ 0,2 mM EDTA-Na
+ 5 μ l GLDH (6 IE, in Glycin, aus Schweinemuskel)

Endwert nach 45 min.

Nach Ablauf dieser Reaktion wird mit 10 μ l Urease, (2 Einheiten, Schwertbohnen) nachgestartet und der Harnstoff nach folgender Formel bestimmt:

Harnstoff + 2 H₂O $\rightarrow$ (NH₄)₂CO₃ $\rightarrow$ + NADH + alpha-KG $\rightarrow$
Glutamat + NAD

Alpha-Ketoglutarat.

Puffer: 500 μ l 0,1 TRA, pH 7,6
+ 100 μ l Extrakt
+ 10 μ l 0,5 M Ammoniumchlorid
+ 5 μ l 6 mM NADH
+ 5 μ l GLDH (6 IE, Schweinemuskel)

Endwert nach 30 min.

Glutamat/Glutamin.

Glutamin wird mit Hilfe der Glutaminase zu Glutamat und Ammoniak umgesetzt und das Glutamat mit dem Enzym GLDH mit NAD und H₂O zu alpha-KG und NADH und NH₃ überführt. Da mit

der zweiten Reaktion sowohl das aus Glutamin gebildete als auch das primär vorhandene Glutamat erfaßt wird, muß zur quantitativen Bestimmung der beiden Substrate in zwei Testansätzen gemessen werden. Der erste Ansatz wird mit Glutaminase über zwei Stunden bei 40° C inkubiert und danach erst die Reaktion mit GLDH gestartet. Im anderen Ansatz wird die Reaktion sofort mit GLDH gestartet. Die Differenz beider Extinktionen ergibt das reine Glutamin.

Glutamat:

Puffer: 400 μ l 0,5 M Glycin, 0,4 M Hydrazinhydrat, pH 9
+ 100 μ l Extrakt
+ 50 μ l 40 mM NAD
+ 10 μ l GLDH (12 IE in Glycin, aus Schweinemuskel)

Glutamin:

Vorinkubation (2 Std) mit Puffer: 200 μ l 0,33 M Na-Acetat, pH 5

+ 200 μ l Extrakt
+ 20 μ l Glutaminase (0,3 IE, E. coli)

nach Inkubation Test wie unter Glutamat.

Alanin:

Puffer: 500 μ l 0,2 M Glycin, 0,2 M Hydrazinhydrat, pH 9,4
+ 100 μ l Extrakt
+ 20 μ l 75 mM NAD
+ 10 μ l Alanindehydrogenase (1,5 IE, Bact. subtilis)

L-Lactat:

Puffer: 500 μ l Glycin-Hydrazin, pH 9,5
+ 50 μ l Extrakt
+ 25 mg NAD
+ 5 μ l LDH (1500 IE/ml, Kaninchenmuskel)
Endwert nach 45 min.

β -Hydroxybutyrat:

Puffer: 500 μ l 0,2 M TRIS, Hydrazinhydrat, pH 8,5
+ 100 μ l Extrakt
+ 25 mg NAD
+ 5 μ l β -HBDH (15 IE/ml, Bact. rhodopseudomonas
speroides)

Endwert nach 30 min.

Pyruvat/Acetoacetat:

Puffer: 400 μ l 0,1 M TRA, 1 mM EDTA mit Kalilauge auf
pH 7,6 eingestellt.
+ 200 μ l Extrakt
+ 10 μ l NADH (0,03 M)
+ 5 μ l LDH (1500 IE/ml)
+ 10 μ l β -HBDH (15 IE/ml)

Endwert nach 15 bzw. 30 min.

3. Ergebnisse.

Aus früheren Perfusionsexperimenten (32) ist bekannt, daß selbst bei längerer Perfusion der im Protein und Aminosäurenstoffwechsel anfallende Stickstoff sofort als Harnstoff gebunden wird, sodaß die Ammoniakkonzentrationen im Perfusat nicht über eine Konzentration von 0,05 mM ansteigen. In den hier vorgelegten Versuchen wurde der Stickstoffmetabolismus mit und ohne zusätzliche Ammoniakbelastung bei Lebern von chronisch urämischen Ratten untersucht und die Ergebnisse mit den von normalen Lebern gewonnenen Daten verglichen. Darüber hinaus wurde versucht, den Prozess der Stickstoffelimination durch Zufuhr von alpha-Ketoglutarat zu beeinflussen.

3.1. Ergebnisse unter Standardbedingungen.

Aus Tabelle 1 ist zu erkennen, daß in den ersten 45 Minuten der Perfusion unter Standardbedingungen Ammoniak sowohl von normalen als auch von chronisch urämischen Lebern nur in geringer Menge an das Perfusat abgegeben wird. Ihre Konzentrationen liegen nach 45 Minuten bei 0,05 bzw. 0,08 mM. Die aus den Konzentrationsänderungen berechneten Produktionsraten für Harnstoff betragen in dieser Phase für die normalen Lebern $5,0 \pm 0,5$ μ Mol/g Leber/h und 5,5 μ Mol/g Leber/h für die chronisch urämischen Lebern (Tab. 2). In dem gleichen Zeitraum werden sowohl Glutamat, Glutamin als auch Alanin in geringer Menge von der Leber an das Perfusat abgegeben. Die nach 45 Minuten erreichten Glutamin-Konzentrationen im Perfusat sind sowohl bei den urämischen als auch bei den normalen Lebern in etwa gleich. Da aber das Leberfeuchtgewicht der urämischen Ratten ca 20% niedriger als das der Kontrolltiere ist, errechnet sich somit für das urämische Kollektiv eine deutlich höhere Ausschüttungsrate für das Glutamin (Tab. 2). Für das Glutamat und Alanin ergeben sich in etwa gleiche Ausschüttungsraten beider Kollektive.

3.2. Ergebnisse nach akuter Ammoniakbelastung (1,5 mM).

3.2.1. Ammoniakabbau (Abb. 1, Tabelle 1).

Ammoniak wurde in Form von Ammoniumchlorid nach 45 minütiger Perfusion über einen Zeitraum von einer Minute zugegeben. Die erreichten Ammoniakkonzentrationen im Perfusat betragen in der 50. Minute sowohl bei den normalen als auch bei den urämischen Lebern in etwa 1,16 mM. Der theoretisch errechnete Wert von 1,5 mM wurde nicht erreicht, da während des verzögerten Mischvorgangs von ca 3 Minuten der Ammoniakabbau der Leber schon eingesetzt hat. Nach der 50. Minute fallen die Ammoniakkonzentrationen im Perfusat beim Normalkollektiv sehr viel schneller ab als bei den urämischen Lebern. Die Halbwertszeit des Ammoniaks im Perfusat ist bei den urämischen Lebern mit 7 Minuten genau doppelt solange wie bei den Lebern von normalen Ratten. Hier muß allerdings erwähnt werden, daß das Lebergewicht von chronisch urämischen Ratten im Mittel um 30% unter dem des Normalkollektivs lag. Nach 60 Minuten liegen die Ammoniakkonzentrationen bei den normalen Lebern im Mittel bei 0,1 mM und haben somit in etwa die Ausgangskonzentrationen erreicht. Bei den urämischen Lebern liegen die Ammoniakkonzentrationen in der 60. Minute im Perfusat mit 0,3 mM noch um den Faktor 3 höher als bei den normalen Rattenlebern. Entsprechend dem schnellen Konzentrationsabfall des Ammoniaks im Perfusat errechnen sich bei den Normallebern höhere Eliminationsraten (Tab. 3); sie liegen um 15% höher als bei den urämischen Lebern. Allerdings geht bei dieser Berechnung das unterschiedliche Lebergewicht mit ein. Die Eliminationsraten betragen zu einem späteren Zeitpunkt nur noch 30% im Falle der Normallebern und ca 50% im Falle der urämischen Lebern. Als mögliche Erklärung können die schon unter die Sättigungskonzentration abgefallenen Ammoniakkonzentrationen gelten. Zwischen der 70. und 80. Minute ist beim Normalkollektiv keine wesentlich gesteigerte Elimination mehr zu messen, während die urämi-

schen Rattenlebern noch mit $7,5 \mu\text{Mol/g Leber/h}$ Ammoniak mit erhöhter Geschwindigkeit binden.

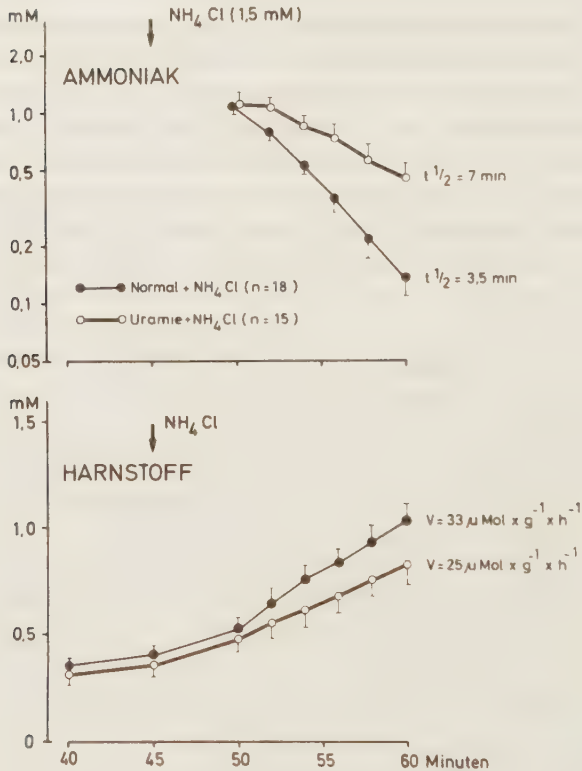


Abbildung 1: Der Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) auf die Ammoniak- und Harnstoffkonzentrationen im rezirkulierenden Perfusat. Der Ammoniak wurde nach 45 min dem Perfusat zugegeben, es wurden die Lebern von normalen und chronisch urämischen Ratten untersucht. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese.

3.2.2. Harnstoffbildung.

Bei ungefähr vergleichbaren Harnstoffkonzentrationen im Perfusat löst die zusätzliche Ammoniakgabe von 1,5 mM in der 45. Minute bei beiden Kollektiven eine vermehrte Ausschüttung von Harnstoff in das Perfusat aus. Die Harnstoffkonzentrationen im Perfusat urämischer Lebern nehmen im Schnitt ungefähr um $0,03 \mu\text{M}$ pro Minute zu (Tab. 4). Dieser Konzentrationsanstieg ist deutlich kleiner als beim Normal Kollektiv, bei dem der Konzentrationssprung in der gleichen Zeiteinheit fast das Doppelte beträgt. Die erreichte Endkonzentration in der 60. Minute ist somit beim Normalkollektiv um etwa 25% höher als bei den urämischen Rattenlebern, wo nur eine Konzentration von $0,82 \mu\text{M}$ in 60 Minuten erreicht wurde. Entsprechend dem steileren Konzentrationsanstieg im Perfusat bei den Normallebern sind die beschriebenen Harnstoffproduktionsraten höher als bei den urämischen Rattenlebern; so beträgt der Unterschied in den ersten zehn Minuten ungefähr 20%. Die gesteigerte Harnstoffbildung hält allerdings bei den urämischen Lebern auch noch in dem Zeitraum zwischen 60. und 80. Minute an, während in dieser Zeit (Tab. 5) beim Normalkollektiv wieder ein Rückgang der Produktionsraten zu verzeichnen ist. Allerdings haben die Ammoniakkonzentrationen bei den Normallebern zu diesem Zeitpunkt bereits die Ausgangswerte erreicht.

3.2.3. Glutamatbildung.

Bei den Normallebern finden sich schon in der Zeit, in der dem Perfusat noch kein Ammoniak zugegeben wurde, etwa doppelt so hohe Glutamatkonzentrationen im Perfusat als bei den urämischen Lebern (Tab. 6). Nach Zugabe von 1,5 mM Ammoniumchlorid in der 45. Minute zeigt sich ein kontinuierlicher Konzentrationsanstieg sowohl bei den Kontrollperfusionen als auch bei den urämischen Rattenlebern. Dieser Anstieg beträgt etwa $0,005 \mu\text{M}$ pro Minute. Nach der 60. Minute liegen somit die Glutamatkonzentrationen bei den Kontrollen um den Faktor 2

höher als bei den urämischen Lebern. Die aus diesen Konzentrationsänderungen berechneten Produktionsraten sind in dem Zeitraum zwischen 50. und 60. Minute, in dem ja der größte Teil des zugegebenen Ammoniaks abgebaut wird, bei den normalen Rattenlebern ebenfalls höher als bei den urämischen Lebern; allerdings ist dieser Unterschied bei der großen Schwankungsbreite nicht so sicher zu werten (Tab. 7). So errechnet sich bei den normalen Rattenlebern in den ersten 6 Minuten nach Ammoniakzugabe eine durchschnittliche Bildungsrate von $2,46 \mu\text{ Mol/g/h}$, während die der urämischen Rattenlebern bei $1,73 \mu\text{ Mol/g/h}$ liegt.

3.2.4. Glutaminbildung.

Im Gegensatz zum Glutamat sind die Ausgangskonzentrationen des Glutamins im Perfusat bei beiden Kollektiven in etwa gleich hoch, nach Ammoniakgabe steigen sie jedoch im Perfusat urämischer Tiere steiler an als beim Vergleichskollektiv (Tab. 8). Im Perfusat der normalen Lebern ist erst in der 54. Minute eine Konzentration von $0,23 \mu\text{M}$ zu messen, während im Perfusat der urämischen Lebern diese Konzentration schon in der 50. Minute gesehen wird. Die urämische Rattenleber erreicht bereits in der 54. Minute eine Konzentration von $0,25 \mu\text{M}$, die beim Normalkollektiv erst in der 60. Minute, wenn der zugegebene Ammoniak verbraucht ist, erreicht wird. Die erhöhte Glutaminbildungsrate (Tab. 2), die schon zu Beginn der Perfusion besteht, ist nach Ammoniakzugabe noch weiter zu beobachten. So schütten die urämischen Rattenlebern in den ersten 6 Minuten nach Stickstoffzufuhr Glutamin mit einer Geschwindigkeit von $6,4 \mu\text{ Mol/g/h}$ aus, während die Normallebern zu dieser Zeit nur eine Bildungsrate von $2,5 \mu\text{ Mol/g/h}$ zu verzeichnen haben (Tab. 9). In dem Zeitraum zwischen 56. und 60. Minute ist die Differenz noch größer. Die urämische Rattenleber liegt nun mit einer Bildungsrate von $6,9 \mu\text{ Mol/g/h}$ um den Faktor 6 höher als die normale Rattenleber. Gegen Ende des Versuchs gleichen sich beide Produktionsraten in etwa an.

3.2.5. Alaninbildung.

Nach Ammoniakgabe kommt es sowohl bei den normalen als auch bei den urämischen Rattenlebern zu einem Anstieg von Alanin im Perfusat, wobei die Zunahme bei den normalen Lebern um den Faktor 2 höher ausfällt als bei den urämischen (Tab. 10). Allerdings ist die Ausgangskonzentration bei den normalen Rattenlebern bereits etwas höher. Im Perfusat normaler Lebern kann in der 60. Minute eine Konzentration von 0,31 mM gemessen werden, während die Konzentration im Perfusat urämischer Rattenlebern schon in der 58. Minute bei einer Konzentration von 0,17 mM stagniert. Auf Tabelle 11 sind die Produktionsraten für Alanin wiedergegeben. Danach löst die Ammoniakgabe bei beiden Kollektiven eine gesteigerte Alaninneubildung aus. Sie beträgt zwischen der 50. und 60. Minute im Fall des Normalkollektivs 9,96 μ Mol/g/h und ist damit um ca 30% höher als beim urämischen Kollektiv. Die Alaninproduktion hält bei den urämischen Rattenlebern in dem Zeitraum zwischen 56. und 60. Minute noch an, während sie bei den normalen Lebern bereits abfällt. Über die 60. Minute hinaus ist bei beiden Gruppen nur noch eine minimale Alaninausschüttung zu beobachten.

3.2.6. Sauerstoffaufnahme.

In den ersten 45 Minuten der Perfusion, wo noch keine Ammoniakzugabe erfolgt, ist der Sauerstoffverbrauch beider Kollektive konstant und liegt bei den urämischen Rattenlebern bei 330 μ g Atom Sauerstoff/g/h, während er bei der Normalgruppe mit 350 μ g Atom Sauerstoff/g/h nur unbedeutend höher ist (Tab. 12). Der in der 45. Minute zugegebene Ammoniak löst bei beiden Kollektiven einen Sauerstoffmehrverbrauch aus, der bei den normalen Rattenlebern mit 425 μ g Atom Sauerstoff/g/h in der 55. Minute seinen Höhepunkt erreicht. Bei den urämischen Rattenlebern fällt der Sauerstoffmehrverbrauch geringer aus; der Maximalwert von 395 μ g Atom Sauerstoff/g/h wird erst in der 60. Minute erreicht.

Der Sauerstoffverbrauch fällt nach der 60. Minute in beiden Kollektiven wieder ab. Dieser Rückgang korreliert mit dem Verschwinden des Ammoniaks aus dem Perfusat; entsprechend der deutlich höheren Harnstoffsyntheserate bei den Kontrolllebern ist auch der Sauerstoffmeherverbrauch steiler und höher als bei den urämischen Lebern.

SAUERSTOFF AUFNAHME DER PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

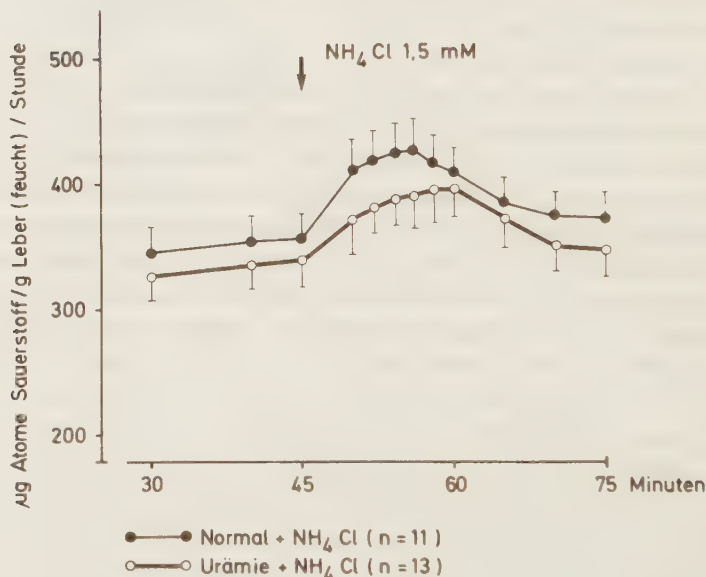


Abbildung 2: Wirkung von NH_4Cl auf die Sauerstoffaufnahme der perfundierten Rattenleber, untersucht wurden Lebern von normalen und chronisch urämischen Ratten.

Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese.

3.2.7. Redoxaequivalente.

3.2.7.1. Lactat/Pyruvat Quotient.

Die Tabelle 13 zeigt den Einfluß von Ammoniak auf die Änderungen des Lactat/Pyruvat Quotienten im Perfusat. Verschiebungen der oxydierten zu reduzierten Partner spiegeln intrazelluläre Redoxveränderungen im NADH System wieder. Bei den Normallebern löst die Ammoniakzufuhr einen Anstieg des Lactat/Pyruvat Quotienten von 8,7 auf maximal 12,82 in der 52. Minute aus. Danach fällt der L/P Quotient konstant ab und erreicht mit 10,43 in der 60. Minute annähernd den Ausgangswert. Bei den urämischen Lebern ist der Ausgangswert mit 6 ohnehin etwas geringer. Die Ammoniakgabe löst auch hier einen Anstieg aus, er ist jedoch flacher und erreicht nur einen Maximalwert von 8,96. Bei dem nachfolgenden langsamen Abfall des L/P Quotienten werden im Falle der urämischen Lebern ebenfalls die Ausgangswerte nur annähernd erreicht.

3.2.7.2. β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat Quotient.

Das Verhältnis des Substratpaares β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat im Perfusat spiegelt das mitochondriale Redoxpotential wieder. In Tabelle 14 ist zu erkennen, daß durch die Ammoniakzugabe ein Abfall dieses Quotienten erfolgt. Während der Ausgangswert vor der Ammoniakzugabe bei beiden Kollektiven in etwa gleich hoch ist, kommt es bei den urämischen Rattenlebern nach Ammoniakzufuhr zu einem Abfall des Quotienten von 0,82 auf 0,58, danach steigt der Quotient wieder leicht an. Der Abfall des β -Hob/Acac Verhältnisses fällt beim Normalkollektiv noch geringer aus; so beträgt hier der Abfall nicht mehr als 10%. Der niedrigste Wert wird in der 54. Minute mit 0,84 erreicht. Danach kommt es zu einem langsamen Ansteigen.

3.3. Ergebnisse nach akuter NH_3 -Belastung und zusätzlicher Gabe von α -KG (0,3 mM).

3.3.1. Ammoniakabbau. (Tab. 15 u. 16), (Abb. 3 u. 4)

Während beim Normalkollektiv durch die Gabe von α -KG in der 40. Minute der Ammoniakabbau im wesentlichen nicht zu steigern ist, kommt es bei den urämischen Lebern unter zusätzlicher α -KG Gabe zu einem beschleunigten Abfall der Ammoniakkonzentrationen im Perfusat. War die Halbwertszeit im Perfusat urämischer Rattenlebern ohne α -KG noch 7 Minuten, ist sie nun unter α -KG auf 4,5 Minuten abgefallen und hat somit fast die Halbwertszeit des Normalkollektivs ohne α -KG Zufuhr erreicht. Die Ammoniakausgangskonzentrationen bei den urämischen Lebern liegt nach α -KG Zufuhr mit 1,19 mM in der gleichen Höhe wie bei den Experimenten, in denen kein α -KG zugegeben wurde. Beim Normalkollektiv, welches α -KG erhalten hat, ist die Ausgangskonzentration für Ammoniak mit 0,99 mM deutlich niedriger als bei der Gruppe, die kein zusätzliches Substrat erhalten hat. Das weist darauf hin, daß unter α -KG der zugesetzte Ammoniak schon sehr früh eliminiert wird. Die Halbwertszeit für den Ammoniakumsatz ergibt bei den Normallebern mit und ohne α -KG Zusatz in etwa den gleichen Wert. Die aus den Konzentrationsänderungen berechneten Eliminationsraten lassen in etwa die gleichen Tendenzen erkennen, wie sie in den unterschiedlichen Halbwertszeiten zu ersehen sind; allerdings kommt es beim Vergleich des Normalkollektivs mit dem urämischen Kollektiv auf Grund des unterschiedlichen Gewichtes zu gewissen Angleichungen. In dem Zeitraum zwischen 50. und 56. Minute, in dem auf Grund der hohen Ammoniakkonzentrationen auf eine Enzymsättigung geschlossen werden kann, beträgt die Eliminationsrate bei den urämischen Ratten 82,4 $\mu\text{Mol/g/h}$ und steigt nach α -KG Zufuhr auf 94 $\mu\text{Mol/g/h}$ an. Somit liegt die Eliminationsgeschwindigkeit auf der gleichen Höhe wie beim Normalkollektiv.

tiv, welches kein alpha-KG bekommen hat. Bei den Normallebern fällt die errechnete Umsatzrate unter alpha-KG Einfluß mit $70,2 \mu \text{ Mol/g/h}$ sogar noch deutlich niedriger aus.

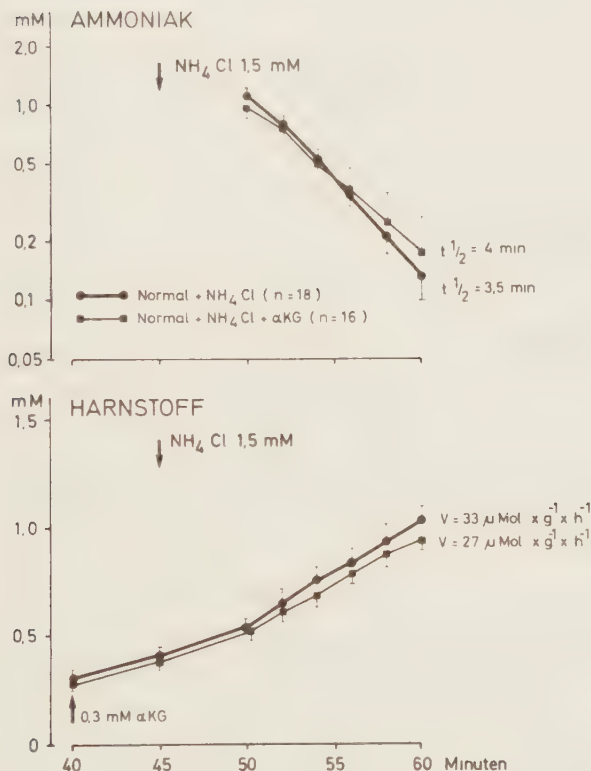


Abbildung 3: Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe auf die Ammoniak- und Harnstoffkonzentrationen im rezirkulierenden Perfusat. Die Untersuchungen wurden an normalen Lebern vorgenommen, wobei NH_4Cl (1,5 mM) in der 45. min und $\alpha\text{-KG}$ (0,3 mM) in der 40. min dem Perfusat zugegeben wurden. Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese.

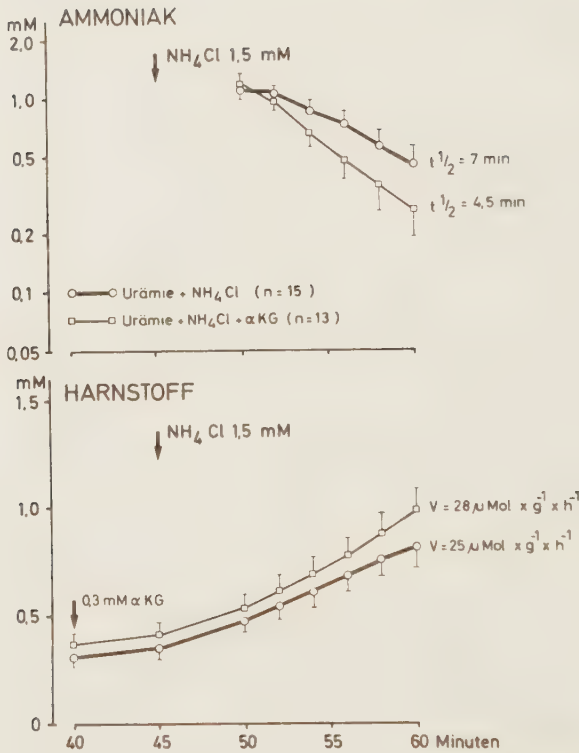


Abbildung 4: Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe auf die Ammoniak- und Harnstoffkonzentrationen im rezirkulierenden Perfusat. Untersucht wurden die Lebern chronisch urämischer Ratten. Ammoniak wurde nach 45 min, α -KG (0,3 mM) schon nach 40 min dem Perfusat zugegeben. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese.

3.3.2. Harnstoffbildung. (Tab. 17 u. 18), (Abb. 3 u. 4)

Bei den normalen Lebern kommt es unter alpha-KG zu keiner weiteren Steigerung der Harnstoffbildung. Die Harnstoffkonzentrationen liegen im Mittel sogar unter der Gruppe, die kein alpha-KG erhalten hat. Bei den urämischen Rattenlebern löst die Zugabe von alpha-KG eine vermehrte Abgabe von Harnstoff an das Perfusat aus, sodaß die mittleren Konzentrationen deutlich über dem des Kollektivs liegen, welches kein Substrat erhalten hat. Die Harnstoffproduktionsrate beträgt zum Zeitpunkt des höchsten Ammoniakumsatzes bei den Normallebern $33 \mu \text{ Mol/g/h}$. Die alpha-KG Zufuhr hat einen Abfall der Produktionsraten auf $27 \mu \text{ Mol/g/h}$ zur Folge. Bei den urämischen Lebern liegt die vergleichbare Harnstoffbildungsrate ohne alpha-KG Gabe bei $25,7 \mu \text{ Mol/g/h}$; sie ist durch die Zufuhr von $0,3 \text{ mM}$ alpha-KG auf $27,8$ zu steigern und liegt somit auf der gleichen Höhe wie bei den normalen Lebern. Zu einem späteren Zeitpunkt, zu welchem der zugesetzte Ammoniak schon wesentlich abgebaut ist, lassen sich jedoch bei den Harnstoffbildungsraten die gleichen Tendenzen erkennen wie zum Zeitpunkt der Substratsättigung.

3.3.3. Glutamatbildung. (Tab. 19 u. 20), (Abb. 5 u. 6)

Die Glutamatkonzentrationen im Perfusat konnten bei den Normallebern mit der alpha-KG Zugabe nicht wesentlich angehoben werden. Dagegen konnte bei den urämischen Lebern die Glutamatausschüttung mit alpha-KG um den Faktor 2 gesteigert werden. Während bei den urämischen Lebern im Perfusat ohne alpha-KG eine Glutamatkonzentration von $0,09 \text{ mM}$ in der 60. Minute erreicht wird, liegt der entsprechende Wert unter alpha-KG bei $0,16 \text{ mM}$. Er kommt somit der Konzentration von $0,18 \text{ mM}$ bei den Normallebern sehr nahe. Die Glutaminbildungsraten beim Normalkollektiv sind mit alpha-KG eher geringer als ohne. Bei den urämischen Lebern läßt sich dagegen unter alpha-KG Zugabe eine erhebliche Steigerung erzielen. So errechnet sich in den Zeitraum zwischen 50. und 60. Minute eine Glutamatbildungsrate von $3,89 \mu \text{ Mol/g/h}$ gegenüber

1,73 μ Mol/g/h bei den entsprechenden Lebern, die kein α -KG erhalten haben. Die Glutamatausschüttung nimmt sowohl bei den normalen als auch bei den urämischen Lebern mit und ohne α -KG bis zur 80. Minute weiterhin zu.

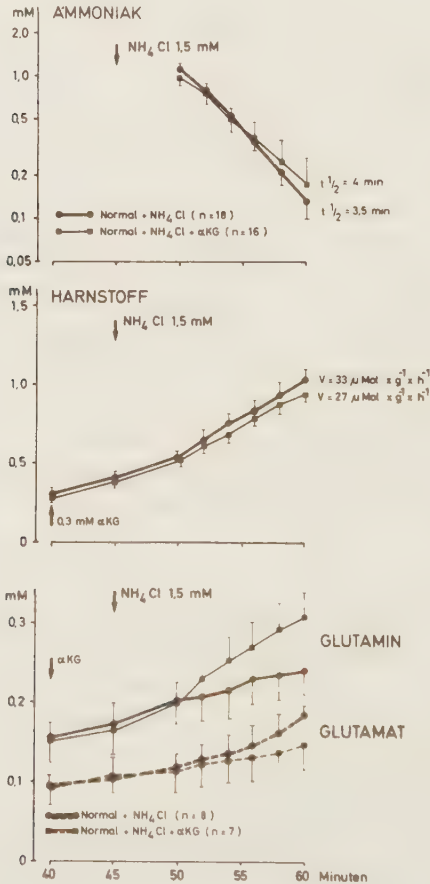


Abbildung 5: Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe auf die Ammoniak- Harnstoff- Glutamat- und Glutaminkonzentrationen im rezirkulierenden Perfusat. Untersucht wurden Lebern von normalen Ratten bei 1,5 mM Ammoniakgabe in der 45. min und 0,3 mM α -KG in der 40. min in den entsprechenden Versuchen. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese.

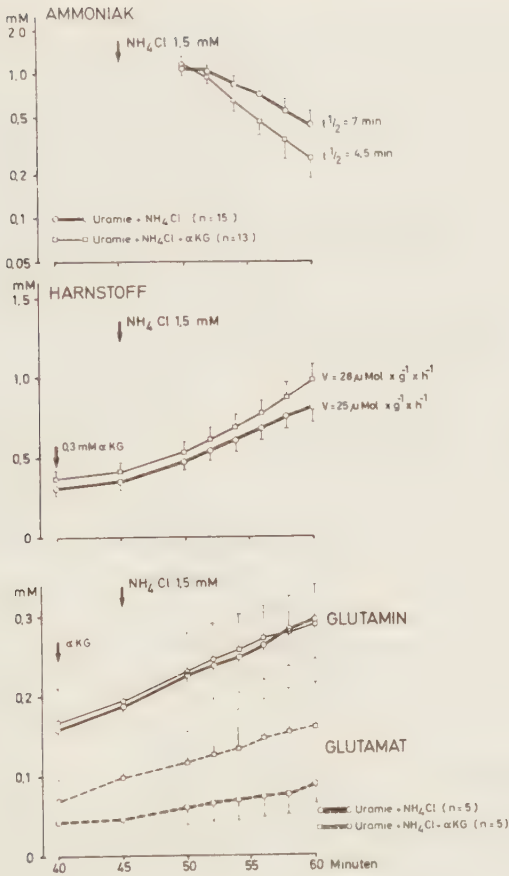


Abbildung 6: Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe auf die Ammoniak- Harnstoff- Glutamat- und Glutaminkonzentrationen im rezirkulierenden Perfusat. Untersucht wurden Lebern chronisch urämischer Ratten mit und ohne α -KG Zugabe. NH_4Cl (1,5 mM) wurde in der 45. min, α -KG (0,3 mM) in der 40. min dem Perfusat zugegeben.

Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese.

3.3.4. Glutaminbildung. (Tab. 21 u. 22), (Abb. 5 u. 6)

Beim Normalkollektiv läßt sich unter alpha-KG ein deutlicher Anstieg der Glutaminkonzentrationen im Perfusat beobachten; er setzt allerdings mit einer gewissen Verzögerung nach Ammoniakgabe ein. Die in der 60. Minute erreichte Konzentration im Perfusat beträgt 0,31 mM. Bei den urämischen Lebern, bei denen schon höhere Ausgangswerte beobachtet werden, läßt sich mit Hilfe von alpha-KG keine nennenswerte Steigerung erzielen. Die in der 60. Minute gemessenen Konzentrationen liegen genauso hoch wie bei den normalen Lebern. Die Glutaminbildungsrate bei den Normallebern ist, wie aus der Tabelle 22 zu ersehen ist, um den Faktor 2,5 zu steigern. In der Zeit zwischen 70. und 80. Minute fällt die Syntheserate dann von dem Maximalwert 6,45 μ Mol/g/h auf 1,22 μ Mol/g/h ab. Während die urämischen Lebern nach 6 minütiger Ammoniumchlorid Zufuhr 6,43 μ Mol/g/h Glutamin produzieren, betrug die Bildungsrate unter den gleichen Bedingungen aber mit alpha-KG 5,15 μ Mol/g/h. Somit ließ sich durch zusätzliche alpha-KG Zufuhr keine weitere Steigerung erzielen. Gegen Ende des Versuches ist die Glutaminsynthese in beiden Kollektiven im wesentlichen abgeschlossen.

3.3.5. Alaninbildung. (Tab. 23, 24, 10, 11)

Die alpha-KG Gabe hat weder auf die Alaninkonzentrationen bei den normalen noch bei den urämischen Lebern einen wesentlichen Einfluß. So kommt es nur zu einem sehr langsamen Anstieg der Konzentrationen im rezirkulierenden Perfusat. (Tab. 10, 23). Auch nach Berechnung der Alaninbildungsraten ist bei den Normallebern durch alpha-KG keine nennenswerte Steigerung zu sehen. Bei den urämischen Lebern fällt der Unterschied mit 6,27 μ Mol/g/h bzw. 10,68 μ Mol/g/h ein wenig deutlicher aus. Ab der 70. Minute ist bei beiden Kollektiven nur noch eine unwesentliche Ausschüttung an Alanin an das Perfusat zu beobachten.

3.3.6. Der alpha-Ketoglutaratabbau. (Tab. 25 u. 26), (Abb. 7)

Unmittelbar nach Zugabe von 0,3 mM alpha-KG zum Perfusat fallen nach der Durchmischung die Konzentrationen ab, und zwar bei den urämischen Lebern etwas schneller als bei den Normallebern. In der 60. Minute beträgt die Konzentration bei den Normallebern noch 0,21 mM, während sie bei den urämischen Lebern bereits auf 0,17 mM abgefallen ist. Entsprechend errechnen sich für das urämische Kollektiv zwischen der 50. und 56. Minute Eliminationsraten, die um den Faktor 2 höher sind als im Normalkollektiv. Während zwischen der 70. und 80. Minute mit 0,9 μ Mol/g/h die Normallebern nur noch sehr wenig alpha-KG aufnehmen, liegt der alpha-KG Verbrauch bei den urämischen Lebern zu diesem Zeitpunkt mit 2,46 μ Mol/g/h deutlich höher.

**α -KETOGLUTARAT AUFNAHME DER PERFUNDIERTEN
RATTENLEBER**

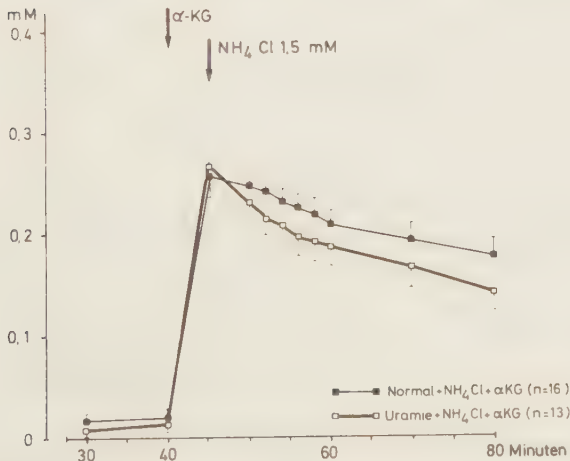


Abbildung 7: Alpha-Ketoglutarataufnahme der perfundierten Rattenleber. Es wurden normale und chronisch urämische Lebern untersucht, wobei α -KG (0,3 mM) in der 40. min, NH_4Cl in der 45. min dem Perfusat zugegeben wurde.

Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese.

3.3.7. Sauerstoffaufnahme. (Tab. 27), (Abb. 8 u. 9)

Mit der zusätzlichen Gabe von alpha-KG fällt der Sauerstoffmehrerverbrauch, der durch die Ammoniakverstoffwechselung bedingt ist, sowohl bei den normalen als auch den urämischen Lebern geringer aus. So beträgt bei den Normalkollektiv der maximale Sauerstoffverbrauch unter NH_3 mit ca. 425 μg Atom Sauerstoff/g/h etwa 20% mehr als unter alpha-KG, während bei den urämischen Lebern die entsprechenden Werte sich 398 und 343 μg Atom Sauerstoff/g/h unterscheiden. Der gesteigerte Sauerstoffverbrauch fällt bei beiden Kollektiven, die alpha-KG erhalten haben, nicht mehr auf die Ausgangswerte zurück. Die Sauerstoffkurve verläuft somit unter alpha-KG Gabe flacher als bei alleiniger Ammoniakbelastung.

SAUERSTOFF AUFNAHME DER PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

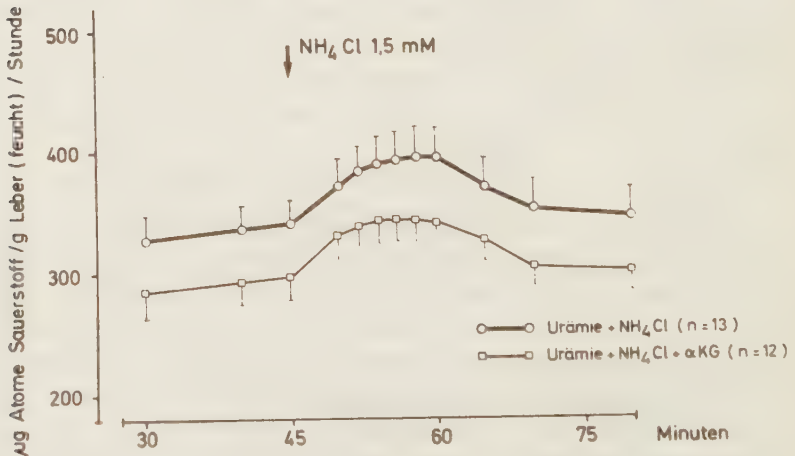


Abbildung 8: Wirkung von NH_4Cl auf die Sauerstoffaufnahme der perfundierten chronisch urämischen Rattenleber, wobei einem Kollektiv in der 40. min zusätzlich $\alpha\text{-KG}$ ins Perfusat gegeben wurde.

Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese.

SAUERSTOFF AUFNAHME DER PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

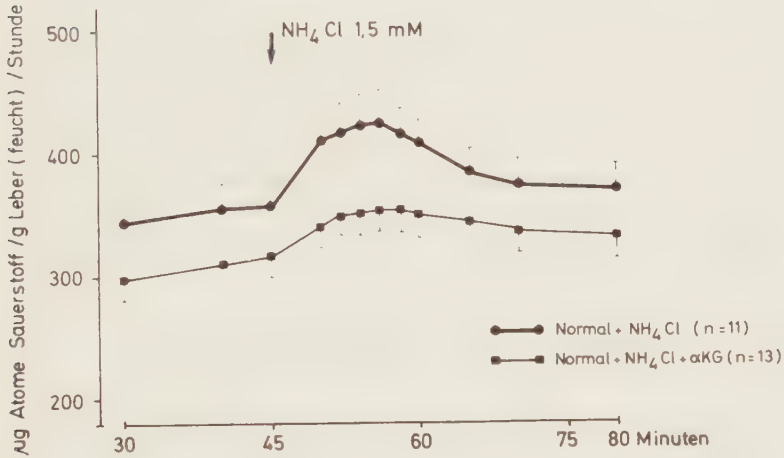


Abbildung 9: Wirkung von NH₄Cl auf die Sauerstoffaufnahme der perfundierten normalen Rattenleber, wobei einem Kollektiv in der 40. min zusätzlich α-KG (0,3 mM) ins Perfusat gegeben wurde.

Angegeben sind Mittelwerte ± S.E.M., Zahl der Experimente in Parenthese.

3.3.8. Die Redoxpotentiale.

3.3.8.1. Der Lactat/Pyruvat Quotient. (Tab. 13 u. 28)

Der Lactat/Pyruvat Quotient, der das cytosolische Redoxpotential repräsentiert, wird bei den Normallebern durch die zusätzliche Gabe von alpha-KG nicht weiter verändert. Bei den urämischen Lebern fällt der L/P Anstieg unter alpha-KG stärker aus als ohne, sodaß annähernd die Werte der Normallebern erreicht werden. Ab der 54. Minute wird der Quotient sowohl bei den urämischen als auch bei den Normallebern wieder kleiner, die Ausgangswerte werden allerdings nicht mehr erreicht.

3.3.8.2. Der β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat Quotient. (Tab. 14 u. 29)

Der β -Hob/Acac Quotient zeigt bei den normalen Lebern unter alpha-KG einen etwas stärkeren Abfall, wobei sich beide Gruppen durch unterschiedliche Ausgangswerte unterscheiden. Bei den urämischen Lebern wird der Abfall des β -Hob/Acac Quotienten durch alpha-KG ebenfalls stärker beeinflusst. Darüber hinaus fällt auch der Wiederanstieg nach dem Minimalwert ausgeprägter aus.

4. Diskussion.

Der wichtigste Abbauweg für den Ammoniak im Organismus ist der Harnstoffzyklus, über den 90% des anfallenden Stickstoffs abgebaut werden. Es wird dabei aus 2 Mol Ammoniak 1 Mol Harnstoff gebildet. Die Harnstoffbildung geschieht ausschließlich in der Leber nach dem von Krebs gefundenen Stoffwechselschema (51).

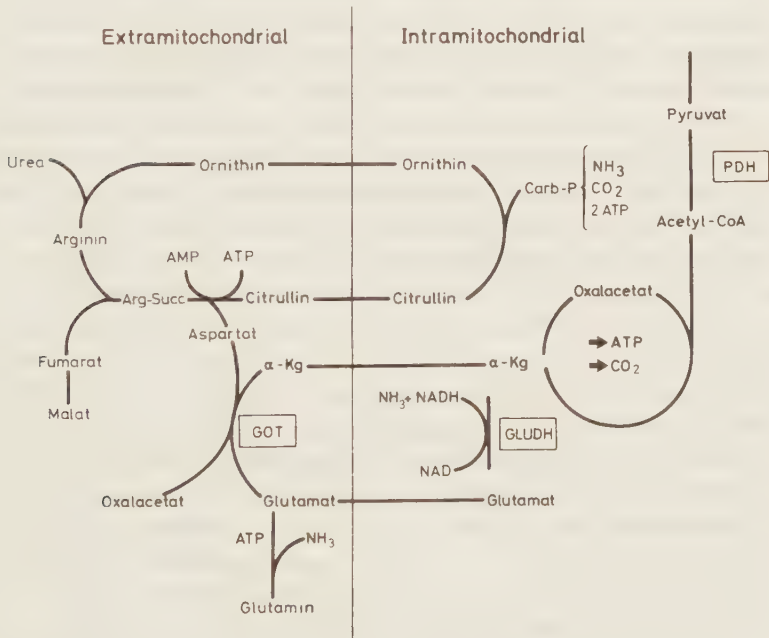


Abbildung 10: Stoffwechselschema für die Harnstoffbildung aus Ammoniak in der Leber.

Der erste Schritt (Abb. 10) findet in den Mitochondrien statt, wo mit Hilfe der Carbamylphosphatsynthetase aus einem Mol Ammoniak und einem Mol Bikarbonat unter Verbrauch von 2 Mol ATP ein Mol Carbamylphosphat entsteht, welches dann mittels der

Ornithincarbamyltransferase mit Ornithin zum Citrullin verbunden wird. Die folgenden Schritte vollziehen sich dann im Cytosol. Hier wird Citrullin mit Aspartat unter Verbrauch von ATP zu Argininosuccinat verbunden; das vermittelnde Enzym ist die Argininosuccinatsynthetase. Mit dem Aspartat wird das zweite Ammoniumion in den Harnstoffzyklus eingeschleust, nachdem zuvor aus alpha-KG und Ammoniak durch die Glutamatdehydrogenase Glutamat gebildet wurde. Das Glutamat, welches in das Cytosol gelangt, gibt dort mit Hilfe der Glutamatoxalacetattransaminase die Aminogruppe an Oxalacetat weiter, wobei je ein Mol Aspartat gebildet wird, was dann unmittelbar in den Harnstoffzyklus eingeschleust werden kann. Für die Glutamatdehydrogenasereaktion wird nach Untersuchungen von Sies (80) vorwiegend NADPH benötigt. Diese Reaktion findet wiederum in den Mitochondrien statt. Ist dieser Prozess der Harnstoffsynthese gestört, sei es durch angeborenen Enzymmangel (42) oder sei es durch eine eingeschränkte Leberfunktion, kommt es zur Akkumulation von Ammoniak im Blut. Auch die chronische Niereninsuffizienz kann als Beispiel für eine gestörte Harnstoffsynthese angesehen werden. Denn bei gestörter Nierenfunktion, die zu einem Anstieg von Harnstoff im Blut führt, werden ebenfalls erhöhte Ammoniakkonzentrationen im Blut beobachtet (17). Darüber hinaus werden sogenannte Nebenprodukte des Harnstoffzyklus wie z.B. Guanidinbernsteinsäure (11, 14, 15, 84) vermehrt im Blut und Urin dieser Patienten gefunden. Beide Veränderungen - sowohl die Hyperammoniämie als auch die Erhöhung sogenannter Nebenprodukte des Harnstoffzyklus im Blut - deuten daraufhin, daß die Urämie zumindest der quantitativ wichtigste Weg des Ammoniakmetabolismus, nämlich die Harnstoffsynthese, gestört ist.

An Hand der vorliegenden Untersuchungen soll versucht werden, die möglichen Ursachen für diese Störungen aufzuzeigen. Gerade in letzter Zeit haben tierexperimentelle Untersuchungen gezeigt, daß die Störung wahrscheinlich im Energie- bzw. Intermediärstoffwechsel liegen und nicht einem einzigen Urä-

mietoxin zuzuordnen sind. Dafür spricht auch, daß nach Untersuchungen von Teilken (85) die Guanidinbernsteinsäure nicht die zentrale Rolle als Urämietoxin spielt, die man ihr lange Zeit zugesprochen hatte (14, 15, 20, 84). Unter anderem haben die Untersuchungen von Teilken, die sich mit dem Einfluß von Guanidinverbindungen auf den Intermediärstoffwechsel der perfundierten Rattenleber beschäftigt haben, gezeigt, daß nach Zufuhr von GBS keinerlei Effekte im Stickstoffmetabolismus zu erkennen waren. Wahrscheinlich muß der Zustand der Urämie längere Zeit bestehen, damit sich derartige Stoffwechselveränderungen einstellen, die den Stickstoffmetabolismus ungünstig beeinflussen. Denn von der akuten Urämie ist bekannt, daß sie im Gegensatz zur chronischen Urämie eher zu einer allgemeinen Aktivierung des Stickstoffmetabolismus führt (56, 88). Die erhöhten Aminosäurekonzentrationen, die immer wieder bei chronischer Urämie gefunden wurden, deuten daraufhin, daß die Leber bei gestörter Harnstoffsynthese noch andere Möglichkeiten der Stickstoffelimination besitzt (1, 16, 39, 46).

Das Modell der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber wurde für diese Untersuchungen deshalb gewählt, weil es auf Grund der eingeschränkten Komplexität erlaubt, auf gezielte Fragestellungen hinsichtlich der Stickstoffelimination bei wenig Störeinflüssen und bei guter Reproduzierbarkeit relativ zuverlässige Antworten geben.

4.1. Mögliche Ursachen für den gestörten Stickstoffmetabolismus in der Urämie.

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich, daß ohne zusätzliches Stickstoffangebot die Leber chronisch urämischer Ratten den Harnstoff mit gleicher Geschwindigkeit bilden kann wie normale Lebern. Die von uns errechneten Produktionsraten liegen mit $5,0 \mu\text{ Mol/g/h}$ bzw. $5,5 \mu\text{ Mol/g/h}$ in der gleichen Höhe, wie die von anderen Arbeitskreisen gefundenen Daten (58). Eine vermehrte Ausschüttung von Glutamin an das Perfusat in dieser Phase kann jedoch als erster Hinweis gelten, daß der Stick-

stoffmetabolismus in der Urämie verändert ist. Bei zusätzlichem Stickstoffangebot wird dieser Unterschied noch deutlicher. Hier kommt es einmal zu einer deutlich geringeren Bildung von Harnstoff und zu einer weiterhin gesteigerten Ausschüttung von Glutamin. Die stündliche Harnstoffausschüttung bei normalen Lebern war bei den vorliegenden Untersuchungen $33 \mu \text{ Mol/g/h}$. Dieser Wert stimmt übrigens gut mit Ergebnissen von Miertsch (58) überein, der bei seinen Untersuchungen an isoliert perfundierten Rattenlebern Ammoniumchloridgabe eine maximale Harnstoffbildungsrate von $34 \mu \text{ Mol/g/h}$ erzielte. Sies (80) und auch Saheki (72) erzielten jeweils $66 \mu \text{ Mol/g/h}$ Harnstoff. Allerdings wurden diese hohen Werte bei einem Stickstoffangebot von $2 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$ erreicht. Darüber hinaus scheint nach diesen Untersuchungen ohnehin keine Steigerung der Harnstoffsynthese möglich. Eine halbmaximale Stimulation der Harnstoffsynthese wurde dagegen bei einer Zufuhr von $0,7 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$ erreicht. Es ist möglich, daß bei unseren Versuchen mit einem einmaligen NH_4Cl Angebot von $1,5 \text{ mM}$ nur in der ersten Phase annähernd Maximalwerte erzielt werden und das in der Phase, in der die Ammoniakkonzentrationen unter $0,3 \text{ mM}$, also der Michaeliskonstanten (79) abfallen, keine Enzymsättigung mehr besteht. Wahrscheinlich sind durch die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen auch die unterschiedlichen Harnstoffbildungsraten bei den verschiedenen Autoren zu erklären. Da die Harnstoffsynthese ein Prozess ist, der sehr viel Energie erfordert, könnte die eingeschränkte Harnstoffsynthesekapazität in der Urämie ein Hinweis dafür sein, daß bei der chronischen Nierenvergiftung der Energiestoffwechsel der Leber gestört ist. Dafür sprechen auch Untersuchungen verschiedener Autoren (14, 22, 29, 44, 86) die in der chronischen Urämie eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und damit eine Hemmung der ATP Bildung fanden. So fand Galloway (22) in der chronischen Urämie eine gehemmte Atmungskettenphosphorylierung und zwar am Übergang zwischen NADH und Cytochrom B. Durch diese Hemmung kommt es zum Rückstau von NADH und somit zur Hemmung des Zitratzyklus, die

wiederum einen verminderten Verbrauch von Pyruvat zur Folge hat. Nach neuen Untersuchungen könnte allerdings auch ein latenter Magnesiummangel für eine Hemmung der Enzyme beitragen (28). Glaze (29) beschreibt dagegen eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in der chronischen Urämie. Außerdem fand er eine gehemmte ATPase, sodaß ATP für manche Energie benötigenden Schritte nicht mehr verfügbar ist. Die Arbeitsgruppe von Cohen und Stein (14, 84) glaubt in der Guanidinbernsteinsäure, einem Nebenprodukt des Harnstoffzyklus in der Urämie, den möglichen Hemmfaktor für die oxidative Phosphorylierung zu sehen. Bessmann (6) sieht in der chronischen Ammoniakintoxikation ganz allgemein die Ursache für die mangelnde Energiebereitstellung. Denn er findet unter diesen Bedingungen eine Hemmung des Zitratzyklus und damit eine Hemmung der ATP Bildung. Tatsächlich konnte John (44) bei chronischer Hyperammoniämie verminderte ATP Spiegel im Lebergewebe messen. Auf Grund dieser erwähnten Untersuchungen ist für die gestörte Harnstoffsynthese in der chronischen Urämie die mangelnde Energiebereitstellung der ausschlaggebende Faktor. Es gibt allerdings Hinweise, daß auch auf Grund einer zu niedrigen Substratsättigung an den Enzymen z.B. alpha-KG und Pyruvat (6) die nachfolgenden Reaktionen nicht mehr mit genügender Geschwindigkeit ablaufen können. Es ist nun nicht sicher zu entscheiden, ob diese Veränderungen im Intermediärstoffwechsel der chronisch urämischen Leber dem hohen Ammoniakgehalt der vor allem im Pfortaderblut besteht (34), oder dem hohen Harnstoffspiegel zuzuschreiben sind. So ist nach Bessmann (6) bei chronischer Hyperammoniämie die oxidative Dekarboxilierung von Pyruvat und alpha-KG gestört. Ebenso fand Campanacci (10) in der Urämie einen verlangsamten Pyruvatabbau und verminderten alpha-KG Abbau. John (44) sagt ebenfalls, daß in der chronischen Ammoniakintoxikation eine Enzymblockade der oxidativen Dekarboxilierung von Pyruvat und alpha-KG auftritt, sodaß diese Substrate im Blut erhöht sind. Renner (69) sah wiederum eine verminderte Utilisation von Pyruvat und alpha-KG in der Urämie. Im Gegensatz dazu

findet man bei der akuten Ammoniakbelastung Veränderungen der Substratkonzentrationen, die eher in Richtung eines Abfallens von alpha-KG zielen. So konnte Williamson (92) bei erhöhter Ammoniakkonzentration das Gleichgewicht der Glutamatdehydrogenase in Richtung Glutamat verschieben. Auch in den vorliegenden Untersuchungen fällt eine gesteigerte Glutamatabgabe an das Perfusat bei den Normallebern auf. Dazu paßt auch, daß nach Ammoniakgabe das intramitochondriale Redoxpotential, welches durch Quotienten β -Hob/Acac repräsentiert wird, in Richtung Oxidation verschoben wird. Denn nach Untersuchungen von Sies (80) ist die GLDH an NADPH/NADP bzw. NADH/NAD gekoppelt, sodaß eine Verschiebung dieses Potentials eine Verschiebung des Gleichgewichts alpha-KG nach Glutamat anzeigt. Bestimmungen der alpha-KG Gehalte im Lebergewebe selbst (67, 79) ergaben in der Tat nach akuter Ammoniakbelastung einen deutlichen Abfall von alpha-KG und einen Anstieg von Glutamat. Auch Brosnan und Prior (8, 67) konnten diesen Befund in Bezug auf den alpha-KG Abfall nach akuter Ammoniakbelastung bestätigen. Ebenso wies Brosnan (8) eine Verkleinerung des β -Hob/Acac Quotienten nach. Die erhöhten Glutamatkonzentrationen im Gewebe und das Abfallen der alpha-KG Spiegel und des β -Hob/Acac Quotienten nach kurzdauernder Ammoniakzufuhr erklärte er ebenfalls durch die Verschiebung der Glutamatdehydrogenasereaktion zur oxidativen Seite hin. Clifford (13) bestimmte die Pyridinnukleotide direkt und konnte einen Abfall der reduzierten Formen bei akuter Ammoniakbelastung finden, ebenso von alpha-KG und Pyruvat. Auch Parilla (65) konnte bei seinen Untersuchungen des Stickstoffmetabolismus an perfundierten Rattenlebern ebenfalls feststellen, daß das zentrale Enzym GLDH an NADPH gekoppelt ist und das bei akuter Ammoniakbelastung das Substratpaar NADPH/NADP in Richtung Oxidation verschoben wird. Der alpha-KG Abfall nach akuter Ammoniakbelastung löst nach Sies (79) eine Aktivierung der PDH aus. Dadurch wird Pyruvat vermehrt aus dem Perfusat aufgenommen und in der Leber dekarboxiliert. Dazu paßt, daß bei kurzdauernder Ammoniakbelastung bei Normal-

lebern eine vermehrte Bildung von CO_2 aus markierten Pyruvat gesehen wird (79). Das erklärt nun auch den steilen Anstieg des L/P Quotienten im Perfusat, den wir nach einmaliger Ammoniakbelastung messen können. Der Quotient steigt um ca 50% an, wobei dieser Anstieg ausschließlich zu Lasten eines Abfalls von Pyruvat geht, während die Lactatspiegel relativ konstant bleiben. Gleiche Veränderungen wurden von Grunst bereits beschrieben (30). Die Ammoniakbelastung löst ja bekanntlich eine Steigerung der Harnstoffsynthese aus, die wiederum zu einem gesteigerten Energieverbrauch führt, was sich im Sauerstoffmehrverbrauch ausdrückt. Als Folge davon fällt der Quotient ATP/ADP und dies ist ein weiterer Stimulus für die PHD (38).

4. 2. Die Umstellung des Stickstoffmetabolismus in der chronischen Urämie.

Bei den urämischen Lebern ist die Halbwertszeit der Ammoniakelimination doppelt so lang wie die von Normallebern, die Harnstoffbildung dagegen um 30% niedriger als im Vergleichskollektiv. Das drückt sich auch in dem geringeren Sauerstoffmehrverbrauch der urämischen Lebern aus. Es ist aber mit 51 μg Atom Sauerstoff/g/h doch höher, als er sich auf Grund der geringeren Harnstoffsynthese mit 27 μg Atom Sauerstoff/g/h errechnen ließe. Das unterstützt die schon oben erwähnte Vermutung, daß die chronisch urämische Leber neben der Harnstoffsynthese noch andere Möglichkeiten zur Stickstoffbindung wahrnimmt. Die Bildung von Guanidinbernsteinsäure allerdings ist nach Untersuchungen von Teilken (85) quantitativ unbedeutend, sodaß sie nicht als echte Möglichkeit überschüssigen Stickstoff zu binden in Betracht gezogen werden kann. Als weitere Möglichkeit der Entlastung des Harnstoffzyklus kommt noch eine gesteigerte Synthese von Aminosäuren in Frage. Die Bestimmungen im Perfusat ergaben zwar keine gesteigerte Glutamatausschüttung, aber eine um ein Vielfaches erhöhte Glutaminausschüttung im Vergleich zum Normalkollektiv. Für die

Bildung von 1 Mol Glutamin wird aber 1 Mol ATP verbraucht und somit ist die oben erwähnte Energiedifferenz geklärt. Die Alaninsynthese als weitere Möglichkeit der Leber Stickstoff in Form von Aminosäuren zu binden, ergab beim urämischen Kollektiv keinen wesentlichen Unterschied zu den Normallebern. Zu diesen Beobachtungen passen auch die Untersuchungen von Ahlberg (1), der in der Urämie, wenn ^{15}N -Harnstoff gefüttert wurde, fand, daß der Stickstoff in Aminosäuren eingebaut wurde, wobei die GLDH und die Glutaminsynthetase eine zentrale Rolle spielten. Eine Reihe von weiteren Autoren (5, 16, 39, 42, 46, 52, 61, 64) stellte fest, daß in der Urämie der Stickstoff zur Aminosäurebildung, speziell zur Glutaminbildung verwendet werden kann. Mittels Isotopenuntersuchungen bewies Berl (5), daß in der Urämie aus Glutamat vermehrt Glutamin gebildet wird und Josephson (46), daß in der Urämie gefütterter Stickstoff vermehrt in Aminosäuren und Protein eingebaut wird. Während Hsia (42) und Palmer (64) bei Enzymstörungen des Harnstoffzyklus neben erhöhten Ammoniakspiegeln auch erhöhte Glutaminspiegel im Blut und Gewebe fand, weisen Krebs (52) und Müting (61) auf die Möglichkeit der Leber hin, in der Urämie vermehrt Aminosäuren wie Glutamin, Alanin und Aspartat bilden zu können und belegten es auch mit Messungen der Spiegel im Blut und Liquor (61). Bei Untersuchungen an Patienten mit chronischer Hyperammoniämie fand nun Pausch (66) erhöhte Konzentrationen für Glutamat, Glutamin, Alanin und Aspartat, wobei er darauf hinweist, daß das Gleichgewicht der GLDH zu 90% in Richtung Glutamat verschoben ist. Der Abfall des β -Hob/Acac Quotienten bei den urämischen Lebern nach Ammoniakbelastung weist ebenfalls daraufhin, daß das Gleichgewicht der GLDH auf der Seite von Glutamat steht. Der Umsatz der GLDH ist allerdings nicht so groß, daß ein so starker alpha-KG Abfall ausgelöst werden könnte, um die PDH zu einem stärkeren Umsatz zu aktivieren. Denn der L/P Quotient steigt nicht annähernd so stark nach Ammoniakbelastung wie im normalen Vergleichskollektiv. So fand John (44) in der Urämie auch erhöhte Pyruvat und alpha-KG Werte, was er mit einer Enzymblockade der oxida-

tiven Dekarboxilierung erklärte. Außerdem fand er noch verminderte Coenzym A Werte und ATP Konzentrationen. Das ist ein Hinweis dafür, daß die gestörte Energiebildung in der Urämie wohl auf einen gestörten Zitratzyklus zurückzuführen ist. Eine andere mögliche Ursache für den geringen alpha-KG Abfall in der Urämie sieht Rajagopalan (68) darin, daß der Harnstoff als solches die GLDH hemmt, sodaß alpha-KG vermindert amidiert werden kann. Dieser verminderte alpha-KG Umsatz könnte nun direkt hemmend auf die PDH wirken (91) und somit auch die Versuchsergebnisse von Renner (69) erklären, der neben erhöhten alpha-KG Spiegeln in der Urämie auch erhöhte Pyruvatwerte fand. Als mögliche Ursache nannte auch er eine Hemmung der PDH, sodaß daraus ein Pyruvatanstau erfolgt.

4.3. Der Einfluß von alpha-KG auf die Ammoniakelimination bei normalen Rattenlebern.

4.3.1. Harnstoffbildung.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Zugabe von 0,3 mM alpha-KG zum Perfusat bei normalen Rattenlebern keinen Einfluß auf die Ammoniakelimination ausübt. Die Harnstoffbildung jedoch liegt mit 27 μ Mol/g/h unter der des Vergleichskollektivs ohne alpha-KG Zugabe, bei dem die Bildungsrate bei 33 μ Mol/g/h lag. Diese verminderte Harnstoffbildung drückt sich auch in einem verminderten Energieverbrauch aus, gemessen an einem geringeren Sauerstoffverbrauch im Vergleich zum Ausgangskollektiv. Die Glutamatproduktion konnte unter alpha-KG nicht mehr gesteigert werden. Das war aber auch nicht zu erwarten. Denn Glutamat ist nur ein Zwischenprodukt in einer Kette, daß sich nicht anhäuft, wenn die nachfolgenden Stoffwechselschritte frei ablaufen können. Ganz im Gegensatz zu Substraten, die sich in einer Sackgasse des Stoffwechsels befinden, weil die nachfolgenden Schritte blockiert sind. Glutamat aber wird ja sofort via Aspartat für die Harnstoffsynthese und über Transaminierung zu weiteren Aminosäurensynthese und somit Proteinsynthese verbraucht, wie später noch belegt

wird.

4.3.2. Glutaminbildung.

Da nun der Ammoniak unter alpha-KG genauso schnell abgebaut wird, obwohl weniger Harnstoff gebildet und weniger Sauerstoff verbraucht wird, liegt die Vermutung nahe, daß der Stickstoff zur Aminosäurenbildung verwendet wird. Die Bestimmung von Glutamin im Perfusat ergab eine Steigerung der Ausschüttungsraten von 2,5 μ Mol/g/h ohne alpha-KG auf 6,4 μ Mol/g/h mit alpha-KG Zugabe. Das ist eine mögliche Erklärung dafür, daß bei alpha-KG Zugabe unter geringerem Energieaufwand gebunden wird. Denn die Glutaminsynthetase braucht nur 1 Mol ATP um 1 Mol NH_3 an Glutamat zu binden, um Glutamin zu bilden, während im Harnstoffzyklus pro Mol NH_3 zwei Mol ATP verbraucht werden. So wird überschüssiger Stickstoff von der Leber unter Umgehung des Harnstoffzyklus mit Hilfe von alpha-KG und GLDH, bzw. Glutaminsynthetase zur Aminosäurenbildung verwendet. Durch diese Stoffwechselumstellung spart die Leber große Mengen an Energie ein. Daneben aber hat die Glutaminbildung als Entlastung der Harnstoffbildung den Vorteil für den Stoffwechsel, daß Glutamin nicht wie Harnstoff ein Endprodukt ist, das durch die Nieren ausgeschieden werden muß, sondern ein wichtiger Baustein, der für die Proteinsynthese ebenso wichtig ist wie als glukoplastische Aminosäure für die Glukoneogenese. Die Ausscheidung von Glutamin über die Nieren ist unbedeutend.

4.3.3. Alaninbildung.

Unter alpha-KG sind weder die Konzentrationen noch die Produktionsraten verändert. Das könnte daran liegen, daß tatsächlich die Alaninbildung nicht weiter gesteigert wird. Es könnte aber auch darauf beruhen, daß Alanin gleich für die Glukoneogenese verwendet wird. Unsere Glukosebestimmungen im Perfusat hatten eine zu große Streuung, um in diesem Punkt eine zuverlässige Aussage zu machen, aber nach Untersuchungen von Dietze (19) wird Alanin als wichtigste glu-

koplastische Aminosäure am meisten von allen Aminosäuren von der Leber aufgenommen - es macht 50% aller Aminosäuren aus - und überwiegend zur Glukoneogenese verwendet. Da 33% aller Aminosäuren der Glukosebildung dienen, ist es klar, daß Alanin für die Glukoneogenese eine nicht unbedeutende Rolle spielt.

4.3.4. Redoxveränderungen.

Die Ammoniakzufuhr in der 45. Minute löst eigentlich keine Veränderung des cytosolischen Redoxpotentials aus, da ja Wasserstoffionen nicht vermehrt ins NAD System hineinfließen. Der Anstieg des L/P Quotienten, der das cytosolische Redoxpotential repräsentiert, geht vielmehr auf Kosten eines Abfalls des Pyruvats durch eine gesteigerte Dekarboxylierung von Pyruvat durch die PDH. Nach Wieland (91) hat das alpha-KG einen gewissen hemmenden Effekt auf die Umwandlung der PDH von der inaktiven zur aktiven Form. Fällt nun die Hemmung durch ein Absinken des alpha-KG Gehalts, weil es zur Glutamatbildung gebraucht wird, weg, wird Pyruvat beschleunigt zu Acetyl-Coenzym A oxidiert und somit vermehrt aus dem Perfusat aufgenommen. Bei alpha-KG Gabe ins Perfusat, nun fällt das Pyruvat nicht zu stark ab und der L/P Quotient steigt nicht so stark an, als bei alleiniger Ammoniakgabe. Eine mögliche Erklärung dafür sah Grunst (30) darin, daß das zugegebene alpha-KG in die Leber gelangt und auf diese Weise die PDH Aktivierung, die nach NH_4Cl Zugabe auftritt, abschwächt. Daß das alpha-KG von der Leber aufgenommen wird, beweisen die Messungen der alpha-KG Spiegel im Perfusat, die nach Zugabe in der 40. Minute kontinuierlich abfielen. Auch von anderen Autoren wird dieses bestätigt (78, 79). Das stärkere Absinken des β -Hob/Acac Quotienten, der das intramitochondriale Redoxpotential widerspiegelt, nach alpha-KG Gabe und zusätzlicher Ammoniakbelastung, kann durch den gesteigerten Umsatz der GLDH erklärt werden, die das vermehrt anfallende alpha-KG reduktiv zu Glutamat amidiert. Bei dieser Reaktion wird reduziertes Pyridinnukleotid vom Wasserstoff

entladen. Nach Untersuchungen von Sies (79) ist daran vor allem das NADPH beteiligt. Die Messungen des alpha-KG im Perfusat ergaben, wie schon oben erwähnt, einen kontinuierlichen Abfall und somit eine Aufnahme in die Leber. Auch Sies bestätigt das (79) und weist darauf hin, daß das Ansteigen des NADP Spiegels auf die Enzyme des Zitratzyklus und somit auf die Energiebereitstellung aktivierend wirken (81).

4.4. Der alpha-KG Einfluß auf den Stickstoffmetabolismus bei urämischen Rattenlebern.

4.4.1. Ammoniakelimination und Harnstoffsynthese.

Bei den urämischen Rattenlebern läßt sich unter zusätzlicher alpha-KG Gabe der Ammoniakabbau erheblich steigern und zwar von $84 \mu \text{ Mol/g/h}$ auf $99 \mu \text{ Mol/g/h}$. Die Harnstoffbildung wird im gleichen Zeitraum von $25 \mu \text{ Mol/g/h}$ auf $28 \mu \text{ Mol/g/h}$ gesteigert und erreicht damit Werte, wie wir sie bei Normallebern messen konnten, wenn dem Perfusat Ammoniak und alpha-KG zugegeben wurde. Die Messungen des alpha-KG's im Perfusat ergab nun, daß die chronisch urämischen Lebern das alpha-KG um den Faktor 2 schneller aufnehmen kann als normale Lebern. Das bestätigt wiederum die Annahme, daß in der Urämie ein relativer alpha-KG Mangel besteht.

4.4.2. Glutamat- und Glutaminbildung.

Die Glutaminbildung, die bei den urämischen Lebern auch schon ohne alpha-KG Zugabe gesteigert war, ließ sich nicht weiter stimulieren. Die Glutaminsynthetase ist offensichtlich nicht weiter zu aktivieren oder anders ausgedrückt: In der Urämie sind maximale Durchflußraten erreicht. Die Glutamatbildung aber ist von $1,7 \mu \text{ Mol/g/h}$ auf $3,8 \mu \text{ Mol/g/h}$ um das doppelte gesteigert. Eine mögliche Erklärung für den Anstieg der Glutamat und Harnstoffbildung unter alpha-KG Zugabe ist, daß in der chronischen Urämie die Verfügbarkeit von alpha-KG für die Glutamat und damit auch für die Harnstoffbildung limitiert

ist und daß durch die Bereitstellung von alpha-KG der Durchsatz der GLDH-Reaktion mit nachfolgender Transaminierung des Glutamats zu Aspartat zu steigern ist und somit mehr Aspartat für den Harnstoffzyklus zur Verfügung steht. Dafür sprechen auch unsere Messungen des alpha-KG's im Perfusat, die zeigten, daß in der Urämie alpha-KG um den Faktor 2 schneller aufgenommen wird als bei Normallebern. Außerdem spricht auch der Sauerstoffmehrverbrauch, bei gleichbleibender Glutaminbildung dafür, daß alpha-KG auf die Harnstoffbildung wirkt. Denn die Sauerstoffmessungen ergaben keine wesentlichen Änderungen gegenüber den Lebern ohne alpha-KG, was zu erwarten wäre, wenn die Leber über andere, ökonomischere Wege als den Harnstoffzyklus die gesteigerte Stickstoffmetabolisierung bewirken würde. Außerdem ergaben ja unsere Messungen wirklich eine gesteigerte Harnstoffproduktion, während die Glutaminbildung keine weitere Steigerung gegenüber dem Kollektiv ohne alpha-KG ergab.

4.4.3. Die Redoxaequivalente.

Der Lactat/Pyruvat Quotient wird durch NH_4Cl Belastung in Richtung reduzierten Partner verschoben. Diese Verschiebung fällt, wie oben beschrieben, beim urämisches Kollektiv geringer aus als bei den Normallebern, weil offensichtlich die PDH nicht so stark aktiviert werden kann. Unter alpha-KG steigt der L/P Quotient nun genauso an, wie bei den Normallebern, was dafür spricht, daß nun die Leber wiederum vermehrt Pyruvat aus dem Perfusat aufnimmt und über die PDH zu Coenzym A abbaut, da ja die Lactatspiegel wenig verändert werden. Eine Erklärung dafür könnte darin liegen, daß der Zitratzyklus, der wie oben öfters beschrieben (6, 20), in der Urämie gehemmt ist, nun wieder aktiviert wird und somit vermehrt Pyruvat als Acetyl-Coenzym A aufnehmen kann. Ein Teil des Pyruvats wird sicherlich auch durch Transaminierung zu Alanin verbraucht (8), wie auch die gesteigerten Alaninproduktionen bestätigen. Eine weitere Möglichkeit ist, daß durch

die gesteigerte Harnstoffbildung Energie verbraucht und damit der ATP/ADP Quotient gesenkt wird, was wiederum die PDH aktiviert und damit eine gesteigerte Pyruvataufnahme zur Folge hat. Außerdem wirkt auch der intramitochondriale Abfall des NADH/NAD Verhältnisses, ausgelöst durch die gesteigerte GLDH, stimulierend auf die PDH (79). Als Maßstab für das intramitochondriale NAD/NADH Verhältnisses diente uns der β -Hob/Acac Quotient, der sich auch bei urämischen Ratten unter alpha-KG in Richtung Oxidation verschiebt, was wiederum auf den vermehrten Umsatz der GLDH nach Ammoniakbelastung hinweist. Eine Steigerung gegenüber der Gruppe ohne alpha-KG war nicht zu sehen. Die GLDH arbeitet bei Ammoniakintoxikation auf vollen Touren.

4.4.4. Alaninbildung.

Auch die Alaninbildung ließ sich unter alpha-KG weiter steigern. Wir interpretieren das so, daß einerseits alpha-KG die PDH hemmt und somit mehr Pyruvat für die Alaninsynthese zur Verfügung steht (8), andererseits aber durch die vermehrte Glutamatbildung mehr Glutamat zur Transaminierung angeboten werden kann. Denn bei Hemmung der Glutamat-Alanin-Transferase andererseits konnte Brosnan (8) keinen Anstieg von Alanin nach NH_4Cl Belastung messen. Alanin ist aber die quantitativ wichtigste Aminosäure für die Leber und hat als glukoplastische Aminosäure eine zentrale Bedeutung für die Glukoneogenese (Dietze 19) und somit auch für den Gesamtstoffwechsel. Fröhlich (21) konnte nun bei akuter Urämie neben einer gesteigerten Harnstoffsynthese, was auch andere Autoren beobachteten (88), auch eine gesteigerte Glukoneogenese und einen vermehrten Proteinkatabolismus sehen, wobei das Alanin vermehrt in die Glukoneogenese eingeschleust wurde. Wahrscheinlich ist auch die gesteigerte Aminosäureaufnahme, die andere Autoren (56) in der akuten Urämie sahen nicht als gesteigerte Proteinsynthese, sondern als aktivierte Glukoneogenese zu interpretieren. Gerok nun fand auch in der chronischen Hyperammoniämie

(24) ebenso wie Counahan (16) in der chronischen Urämie hohe Alaninspiegel im Blut. Die Alaninbildung spielt nun sicherlich für die Ammoniakentgiftung eine Rolle.

4.4.5. Die Bedeutung der Stoffwechselveränderungen in der chronisch urämischen Leber bei alpha-KG Gabe.

Die Bedeutung der Stoffwechselveränderungen in der urämischen Leber durch alpha-KG liegen wahrscheinlich nicht so sehr darin, daß vermehrt Harnstoff produziert werden kann; denn gerade in der chronischen Niereninsuffizienz ist ja seine Ausscheidung gestört. Wahrscheinlich bedeutsamer ist die Tatsache, daß mit der Zufuhr des Kohlenstoffskeletts die Synthese von Aminosäuren, wie Glutamin und Alanin und Glutamat begünstigt wird. Weitere Aminosäuren wurden von uns nicht gemessen. Inwieweit das Einfließen von Glukose von Bedeutung ist, wurde für die chronische Niereninsuffizienz noch nicht untersucht; bei der akuten Urämie zumindest wurden dadurch die Glykogenspeicher der Leber aufgefüllt (Föhlich 21). Viel entscheidender aber ist die Senkung der Hyperammoniämie, die auf jeden Fall in der chronischen Urämie im Pfortaderblut meßbar vorhanden ist (34) und damit auch zur Stoffwechselumstellung führt. In der letzten Zeit wurden ohnehin zur Behandlung der Harnstoffvergiftung auf Grund einer Niereninsuffizienz neben den klassischen Behandlungsansätze wie Proteinrestriktion in Form von Kartoffel - Ei - Diät, Spezialdiäten, die die Zufuhr der essentiellen Aminosäuren gewährleisten, mit Ketoanalogen angeboten, um so den Ammoniak zusätzlich zu binden. Das liefern dann auch die Aminosäuren, die zwar nicht essentiell sind, aber, wenn man es vom Stoffwechsel her betrachtet, so wichtig sind, daß der Körper sie selbst synthetisiert und sich nicht auf die Zufuhr von außen verläßt. Tatsächlich gibt es schon zahlreiche klinische und experimentelle Untersuchungen. Hodler (39) bestätigt unsere Vermutungen, daß die Leber aus dem angebotenen Kohlenstoffskelett und dem überschüssig anfallenden Stickstoff via Amidierung und Transaminierung

Aminosäuren bilden kann. Er erzeugte, indem er Harnstoff in großen Mengen verfütterte, eine Hyperammoniämie, wie sie der in der chronischen Urämie gleichkommt und konnte dann, indem er Kohlenstoff in Form von Kohlenhydraten verfütterte, eindeutig den Ammoniak im Blut senken. Ähnlich konnte Hsia (42) bei experimenteller Hyperammoniämie mit Ketosäuren, aber auch mit Ornithin-alpha-KG die Ammoniakentgiftung deutlich fördern. Nach eigenen früheren Untersuchungen (33) hat Ornithin tatsächlich einen zusätzlichen Effekt auf die Stickstoffentgiftung, der darauf beruht, daß am Enzym der Carbamylsynthetase in der Urämie nicht genügend hohe Substratkonzentrationen vorliegen, das mit der Zufuhr von Ornithin ausgeglichen werden kann. Ebenfalls von Erfolgen in der Senkung einer Hyperammoniämie mit Ketoanalogen schreibt Holm (41), der allerdings ein Kombinationspräparat verwandte. Bei gesunden Lebern allerdings konnte er, was auch unseren Beobachtungen entspricht keinen Effekt hinsichtlich der Ammoniakverwertung oder der Harnstoffsynthese erzielen. Leinweber (55) sieht die Hauptstörung der chronischen Ammoniakintoxikation in der Hemmung des Zitratzyklus, wofür ja auch die relativ hohe Pyruvatkonzentration spricht. Wahrscheinlich ist es auch der hohe Ammoniakspiegel, der diese Veränderungen auch in der chronischen Urämie verursacht, denn in der akuten Urämie wurden ja eher gesteigerte Enzymaktivitäten gemessen (56, 88). Mit alpha-KG konnte Leinweber (55) zwar im Gegensatz zu unseren Bestimmungen die Harnstoffsynthese bei chronischen Hyperammoniämie nicht steigern, die Ammoniakspiegel aber ebenso wie wir senken. Eine weitere Bestätigung für die Vermutung, daß der Stickstoff in die Aminosäurenbildung einfließt, zumal auch Leinweber einen Abfall der β -Hydroxybutyratspiegel messen konnte, was ja darauf hin deutet, daß vermehrt Glutamat gebildet wird. Glutamat wiederum spielt ja eine zentrale Rolle für die Stickstoffübertragung und damit für die Bildung weiterer Aminosäuren. Walser (89) bestätigt mit ähnlichen Untersuchungen diese Ergebnisse und weist darauf hin, daß ge-

rade alpha-KG sich besonders zur Amidierung eignet. Eine Reihe von weiteren Autoren (25, 26, 27, 70, 71) bestätigt, daß urämische Patienten den überschüssigen Harnstickstoff zur Resynthese nichtessentieller Aminosäuren verwenden kann. Der aus Harnstoff stammende Stickstoff wird vermehrt zur Bildung von Aminosäuren verwendet, wenn deren Kohlenstoffskelett in der Nahrung angeboten wird. Bergström (4) fand unter Gabe von Ketoanalogen eine verbesserte Stickstoffbilanz, weil der Stickstoff zur Eiweißsynthese verbraucht wird und damit nicht mehr durch die Nieren verloren geht. Klinische Erfolge mit Ketoanalogen bei chronischer Hyperammoniämie beschreibt Böhles (7), der seine Untersuchungen bei angeborenen Störungen der Harnstoffsynthese machte: Mit dem Abfall ging auch die neurologische Symptomatik zurück. Dazu beobachtete der Autor erhöhte Aminosäurespiegel, was die oben beschriebene Theorie der gesteigerten Aminosäuresynthese unter Ketoanalogen bestätigt. Die Proteinsynthese ganz allgemein untersuchte Lamberts (53) und sein Team und machten die Beobachtung, daß nach Gabe von Ketoanalogen in der chronischen Urämie die Proteinsynthese noch mehr gesteigert wird als die Aminosäuresynthese, was dafür spricht, daß die zusätzlich gebildeten Aminosäuren nicht im Urin ausgeschieden werden, sondern zur Proteinsynthese verwendet werden. Ähnliche Beobachtungen machte auch Bauerdick (2), der mit Hilfe von Ketoanalogen bei strenger Urämie die Aminosäuren- und Eiweißsynthese gebessert sah. Außerdem wurde die Stickstoffbilanz positiv. Neuhäuser (63), der die selbe Beobachtung machte, maß den Ketoanalogen nicht diese Bedeutung bei. Sehr umfassende Untersuchungen mit Ketoanalogen in der chronischen Urämie machte Spellerberg (83) und sah dabei ebenfalls wie wir bei unseren Untersuchungen einen Anstieg der Harnstoffsynthese, der sogar mit einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs einherging, was ja wiederum zur gesteigerten Harnstoffsynthese paßt, die sehr viel Energie verbraucht. Daneben trat eine Minderung des Eiweißkatabolismus ein, die durch die Reutilisation endogenen Harnstoff-

fes zustande kam. James (43) beobachtete außerdem bei chronischer Ammoniakintoxikation, daß die anaerobe Glykolyse gesteigert war und Mc Khann (57) fand bei chronischer Ammoniakintoxikation eine Lactatacidose, deren Ursache er neben der gesteigerten Glykolyse in einer Störung des Abbaus von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A, also in der Störung des Zitratzyklus sah. Die erhöhten Pyruvatkonzentrationen deuten darauf hin. So ist nun der von uns beobachtete mangelnde Pyruvatabfall und der geringere Sauerstoffverbrauch bei akuter Ammoniakbelastung in der chronischen Urämie neben den gestörten Zitratzyklus auch auf eine gesteigerte Glykolyse zurückzuführen. Diese gesteigerte anaerobe Glykolyse konnte James (43) bei chronischer Hyperammoniämie mit alpha-KG bremsen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß durch alpha-KG der Zitratzyklus aktiviert wird und damit auf aerobe Energieversorgung über die Atmungskette umgestellt wird, die ja wie oben beschrieben in verschiedenen Punkten gestört ist (22, 29) und damit mehr Energie für die Harnstoffsynthese bereitstellen kann. Eine weitere Möglichkeit für die Steigerung der Harnstoffsynthese in der chronischen Urämie durch Ketoanaloge liegt vielleicht in der Beobachtung von Kim (47), daß mit N-Acetylen-L-Glutamat über den Weg der Enzymaktivierung die Harnstoffsynthese zu steigern war. N-Acetylen-L-Glutamat entsteht nun aus Glutamat und Acetyl-Coenzym A. Vielleicht wirkt auch über diesen Mechanismus steigernd auf die Harnstoffsynthese in dem es mehr Glutamat zur Verfügung stellt. Wir konnten nun sehen, daß Ketoanaloge in der chronischen Urämie auf die Intoxikationserscheinungen, auf die Hyperammoniämie, auf die Harnstoffsynthese, auf den Proteinstoffwechsel und sogar auf den Glukosestoffwechsel Einfluß nimmt. Somit ist es nur folgerichtig, daß die wohl verschiedenen Ketoanaloge in Zukunft auch in Diätplänen chronisch urämischer Patienten Einzug halten, in denen dann der Eiweißgehalt und damit das Stickstoffangebot niedrig gehalten werden kann, weil wichtige Aminosäuren durch ihre entsprechenden Ketosäuren im Organismus selbst gebildet werden können.

5. Zusammenfassung.

An Hand des Modells der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber im rezirkulierenden System wurde der Stickstoffmetabolismus der Leber von normalen und chronisch urämischen Ratten untersucht. Dabei wurde insbesondere der Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe ($1,5 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$) auf die Ammoniakelimination, die Harnstoffproduktion, die Glutamat-, Glutamin- und Alaninbildung, den Sauerstoffmehrverbrauch und die Änderungen der Redoxaequivalente Lactat/Pyruvat und β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat untersucht. Diese Experimente wurden mit und ohne zusätzliche Gabe von alpha-Ketoglutarat ($0,3 \text{ mM}$) durchgeführt.

1. Lebern von normalen Ratten eliminieren im Überschuß hinzugefügten Ammoniak vor allem durch eine gesteigerte Harnstoffbildung, entsprechend dieser Synthesesteigerung kommt es zu einem Sauerstoffmehrverbrauch, außerdem gibt die Leber Glutamat, Glutamin und Alanin an das Perfusat ab. Pyruvat wird vermehrt aus dem Perfusat entnommen, als Erklärung kommt ein Wegfall der Hemmung der Pyruvatdehydrogenase in Frage. Die Folge ist ein Anstieg des Lactat/Pyruvat Quotienten im Perfusat. Dagegen fällt der Quotient β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat ab, was durch einen vermehrten Durchsatz der Glutamatdehydrogenase Reaktion in den Mitochondrien bedingt ist.

2. Urämische Rattenlebern eliminieren im Überschuß hinzugegebenen Ammoniak langsamer als normale Rattenlebern. Darüberhinaus ist die Harnstoffbildung eingeschränkt. Als Kompensation wird vermehrt Glutamin und zum Teil auch Alanin gebildet. Der Sauerstoffmehrverbrauch fällt entsprechend geringer aus als im Normalkollektiv. Pyruvat wird nur in geringen Ausmaß von der Leber aus dem Perfusat aufgenommen, weshalb der Quotient Lactat/Pyruvat im Perfusat unwesentlich ansteigt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß in der chronischen Urämie verschiedene Enzymsysteme und vor allem auch der Zitratzyklus blockiert sind, sodaß sich Pyruvat anstaut. Der Quotient β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat fällt ab, was darauf

hindeutet, daß auch in der chronischen Urämie die Glutamatdehydrogenase in Richtung Glutamat verschoben wird.

3. Bei den normalen Rattenlebern läßt sich mit alpha-Ketoglutarat keine Steigerung der Ammoniakelimination erzielen; allerdings wird der zugeführte Stickstoff "ökonomischer" beseitigt. Die Harnstoffsynthese ist unter diesen Bedingungen reduziert, während die Glutaminbildung gesteigert ist. Die Glutamatausschüttung sowie die Alaninproduktion sind im wesentlichen unverändert. Auch der Sauerstoffmehrerverbrauch fällt unter diesen Bedingungen geringer aus. Der Einfluß auf den Lactat/Pyruvat Quotienten fällt geringer aus als beim Vergleichskollektiv, vermutlich wird die Pyruvatdehydrogenase durch alpha-Ketoglutarat gehemmt, dazu paßt, daß die Leber weniger Pyruvat aus dem Perfusat aufnimmt.

4. Bei den urämischen Rattenlebern bewirkt die zusätzliche Gabe von alpha-Ketoglutarat eine gesteigerte Elimination des zugesetzten Ammoniaks vor allem durch eine gesteigerte Harnstoffsynthese. Die Glutaminbildung ist nicht weiter zu stimulieren, dagegen erreicht die Glutamatbildung Werte des Normalkollektivs. Auch der Lactat/Pyruvat Quotient gleicht sich an das Normalkollektiv an. Das alles deutet darauf hin, daß in der chronischen Urämie die Verfügbarkeit von alpha-Ketoglutarat insbesondere für den Harnstoffzyklus limitiert ist.

5. In der Urämie ist also eine Steigerung der Entgiftung von Ammoniak mit Hilfe von Ketosäuren möglich, wobei eine Steigerung der Harnstoffsynthese in Kauf genommen werden muß. Möglicherweise kann durch die Zufuhr von Ketoanalogen neben einer Steigerung der Aminosäuresynthese auch eine Verbesserung des Eiweißstoffwechsels erzielt werden. Mit der zusätzlichen Gabe von Ketosäuren könnte somit der Eiweißgehalt und damit auch der Stickstoffgehalt in der Diät des Urämikers gesenkt werden, was bereits in der Praxis versucht wird.

ANHANG

Tabelle 1

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) auf die Ammoniakkonzentrationen (mM) im rezirkulierenden Perfusat bei normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	45	50	52	54	56	58	60
Normal								
(17)	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	1,16 ± 0,07	0,76 ± 0,06	0,50 ± 0,05	0,36 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,13 ± 0,02
Urämisch								
(15)	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,01	1,14 ± 0,11	1,08 ± 0,09	0,85 ± 0,01	0,79 ± 0,11	0,57 ± 0,10	0,46 ± 0,10

Angegeben sind die Mittelwerte ± S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 3

Ammoniakeliminationsraten (μ Mol/g Leber/Stunde) perfundierter Lebern von normalen und urämischen Ratten nach Ammoniakbelastung (1,5 mM).

Zeit (Min)	50 - 56	56 - 60	60 - 70	70 - 80
Normal	93,00	35,70	5,58	1,35
(17)	$\pm 12,20$	$\pm 4,81$	$\pm 1,27$	$\pm 0,61$
Urämisch	82,37	46,34	14,49	7,55
(15)	$\pm 21,85$	$\pm 5,71$	$\pm 3,29$	$\pm 1,82$

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.

NH₄Cl wurde nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 4

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) auf die Harnstoffkonzentrationen (mM) im rezirkulierenden Perfusat bei normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	45	50	52	54	56	58	60
Normal (18)	0,30	0,40	0,53	0,65	0,76	0,83	0,93	1,03
	± 0,03	± 0,04	± 0,04	± 0,05	± 0,05	± 0,05	± 0,06	± 0,06
Urämisch (15)	0,27	0,36	0,47	0,54	0,60	0,67	0,75	0,82
	± 0,03	± 0,04	± 0,05	± 0,05	± 0,06	± 0,06	± 0,07	± 0,08

1
5
3
1

Angegeben sind die Mittelwerte ± S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
NH₄Cl wurde nach 45 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 5

Harnstoffproduktionsraten (μ Mol/g Leber/Stunde) perfundierter Lebern von normalen und urämischen Ratten nach Ammoniakbelastung (1,5 mM).

Zeit (Min)	50 - 56	56 - 60	60 - 70	70 - 80
Normal (18)	33,26 ± 6,36	34,67 ± 4,22	14,34 ± 1,59	8,94 ± 1,56
Urämisch (15)	25,70 ± 3,30	26,55 ± 3,28	26,59 ± 1,91	20,74 ± 4,32

Angegeben sind die Mittelwerte ± S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 6

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) auf die Glutamatkonzentrationen (mM) im rezirkulierenden Perfusat bei normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	45	50	52	54	56	58	60
Normal								
(8)	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,02
Urämisch								
(5)	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,09 ± 0,02

- 55 -

Angegeben sind die Mittelwerte ± S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 7

Glutamatsyntheseraten (μ Mol/g Leber/Stunde) perfundierter Lebern von normalen und urämischen Ratten nach Ammoniakbelastung (1,5 mM).

Zeit (Min)	50 - 56	56 - 60	60 - 70	70 - 80
Normal	2,46	4,79	1,76	2,36
(8)	$\pm 1,16$	$\pm 1,73$	$\pm 0,31$	$\pm 0,59$
Urämisch	1,73	2,62	1,52	1,40
(5)	$\pm 1,44$	$\pm 0,70$	$\pm 0,62$	$\pm 0,85$

- 56 -

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 8

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) auf die Glutaminkonzentrationen (mM) im rezirkulierenden Perfusat bei normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	45	50	52	54	56	58	60
Normal	0,13	0,19	0,21	0,22	0,23	0,24	0,24	0,25
(8)	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$
Urämisch	0,12	0,19	0,23	0,24	0,25	0,26	0,28	0,29
(5)	$\pm 0,02$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 9

Glutaminsyntheseraten (μ Mol/g Leber/Stunde) perfundierter Lebern von normalen und urämischen Ratten nach Ammoniakbelastung (1,5 mM).

Zeit (Min)	50 - 56	56 - 60	60 - 70	70 - 80
Normal (8)	2,53 ± 1,63	1,16 ± 1,43	3,10 ± 1,20	0,08 ± 1,36
Urämisch (5)	6,43 ± 3,87	6,98 ± 2,82	3,82 ± 2,13	0,30 ± 0,84

Angegeben sind die Mittelwerte ± S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 10

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) auf die Alaninkonzentrationen (mM) im rezirkulierenden Perfusat bei normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	45	50	52	54	56	58	60
Normal								
(18)	0,07 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,17 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,31 ± 0,04
Urämisch								
(13)	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,02

Angegeben sind die Mittelwerte ± S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min dem Perfusat zugegeben.

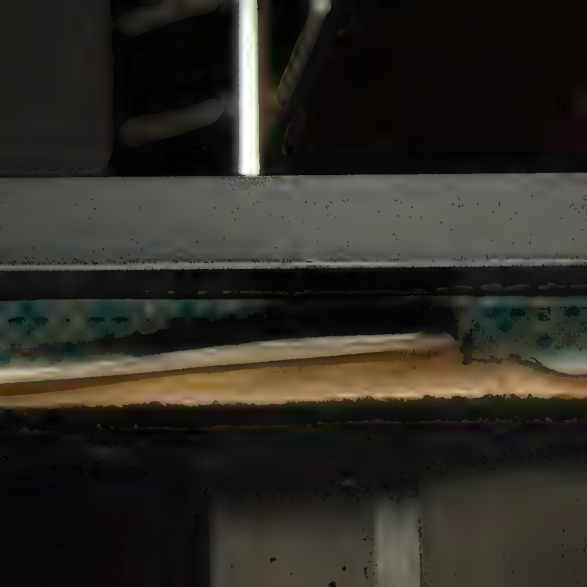


Tabelle 12

Sauerstoffaufnahme (μg Atome Sauerstoff/g Leber/Stunde) perfundierter Lebern von normalen und urämischen Ratten nach Ammoniakbelastung (1,5 mM).

Zeit (Min)	30	40	45	50	55	60	65	70	80	
Normal	344	356	357	412	425	410	387	377	373	1
(11)	± 19	± 19	± 20	± 23	± 24	± 20	± 17	± 18	± 18	6
Urämisch	328	336	341	373	392	395	371	353	345	1
(13)	± 19	± 18	± 17	± 17	± 20	± 20	± 18	± 18	± 18	

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 13

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) auf die Änderungen des Laktat/Pyruvat Quotienten im rezirkulierenden Perfusat bei normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	45	50	52	54	56	58	60
Normal	8,73	8,70	11,25	12,82	12,04	11,55	10,75	10,43
(19)	$\pm 0,67$	$\pm 0,23$	$\pm 0,83$	$\pm 1,04$	$\pm 0,93$	$\pm 0,83$	$\pm 0,85$	$\pm 0,92$
Urämisch	6,34	6,08	7,94	8,78	8,96	8,59	8,26	7,65
(15)	$\pm 0,48$	$\pm 0,56$	$\pm 0,85$	$\pm 1,09$	$\pm 1,19$	$\pm 1,85$	$\pm 0,78$	$\pm 0,85$

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 14

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) auf die Änderungen des β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat Quotienten im rezirkulierenden Perfusat bei normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	45	50	52	54	56	58	60
Normal (19)	0,88 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,11	0,90 $\pm$ 0,11	0,85 $\pm$ 0,08	0,84 $\pm$ 0,09	0,86 $\pm$ 0,09	0,94 $\pm$ 0,11	0,99 $\pm$ 0,10
Urämisch (15)	0,99 $\pm$ 0,19	0,82 $\pm$ 0,13	0,65 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,11	0,58 $\pm$ 0,11	0,58 $\pm$ 0,10	0,62 $\pm$ 0,10

1 63 1

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 15

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) und α -Ketoglutarat (0,3 mM) auf die Ammoniakkonzentrationen im rezirkulierenden Perfusat von normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	40	45	50	52	54	56	58	60
Normal (16)	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,99 ± 0,11	0,77 ± 0,12	0,51 ± 0,10	0,35 ± 0,10	0,25 ± 0,09	0,18 ± 0,08
Urämisch (13)	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	1,19 ± 0,13	0,98 ± 0,10	0,65 ± 0,09	0,47 ± 0,09	0,35 ± 0,09	0,26 ± 0,07

- 64 -

Angegeben sind die Mittelwerte ± S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min, α KG. nach 40 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 16

Einfluß von α -Ketoglutarat (0,3 mM) auf die Ammoniakutilisationsraten (μ Mol/g Leber/Stunde) im rezirkulierenden Perfusat bei normalen und urämischen Rattenlebern nach einmaliger Ammoniakzufuhr (1,5 mM).

Zeit (Min)	50 - 56	56 - 60	60 - 70	70 - 80
Normal (16)	70,24 $\pm$ 8,26 —	26,18 $\pm$ 3,28 —	4,82 $\pm$ 2,14 —	2,38 $\pm$ 1,46 —
Urämisch (13)	94,93 $\pm$ 14,11 —	39,90 $\pm$ 6,59 —	19,98 $\pm$ 8,19 —	2,33 $\pm$ 0,77 —

- 65 -

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 α -Kg. wurde nach 40 min, NH_4Cl nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 17

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) und α -Ketoglutarat (0,3 mM) auf die Harnstoffkonzentrationen im rezirkulierenden Perfusat von normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	40	45	50	52	54	56	58	60	
Normal	0,27	0,33	0,39	0,54	0,63	0,70	0,79	0,89	0,94	1
(16)	$\pm$ 0,03	$\pm$ 0,03	$\pm$ 0,03	$\pm$ 0,04	$\pm$ 0,04	$\pm$ 0,04	$\pm$ 0,04	$\pm$ 0,04	$\pm$ 0,04	6
Urämisch	0,29	0,37	0,42	0,54	0,62	0,70	0,77	0,88	0,99	1
(13)	$\pm$ 0,05	$\pm$ 0,04	$\pm$ 0,05	$\pm$ 0,06	$\pm$ 0,07	$\pm$ 0,08	$\pm$ 0,08	$\pm$ 0,08	$\pm$ 0,09	6

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.

NH₄Cl wurde nach 45 min, α -KG. nach 40 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 18

Harnstoffproduktionsraten (μ Mol/g Leber/Stunde) perfundierter Lebern von normalen und urämischen Ratten nach Ammoniakbelastung (1,5 mM) und zusätzlicher Gabe von α -Ketoglutarat (0,3 mM).

Zeit (Min)	50 - 56	56 - 60	60 - 70	70 - 80
Normal (16)	27,29 $\pm$ 3,44	21,69 $\pm$ 2,43	12,42 $\pm$ 1,63	6,98 $\pm$ 1,26
Urämisch (13)	27,76 $\pm$ 4,31	38,03 $\pm$ 3,40	19,92 $\pm$ 3,54	14,37 $\pm$ 3,28

Angabegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 α -Kg. wurde nach 40 min, NH_4Cl nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 19

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) und α -Ketoglutarat (0,3 mM) auf die Glutamatkonzentrationen im rezirkulierenden Perfusat von normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	40	45	50	52	54	56	58	60
Normal	0,07	0,09	0,11	0,12	0,12	0,13	0,13	0,14	0,15
(7)	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$
Urämisch	0,06	0,07	0,10	0,12	0,13	0,13	0,15	0,16	0,16
(5)	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$

- 68 -

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min, α KG. nach 40 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 20

Glutamatsyntheseraten (μ Mol/g Leber/Stunde) perfundierter Lebern von normalen und urämischen Ratten nach Ammoniakbelastung (1,5 mM) und zusätzlicher Gabe von α -Ketoglutarat (0,3 mM).

Zeit (Min)	50 - 56	56 - 60	60 - 70	70 - 80
Normal	1,60	2,37	1,89	2,91
(7)	$\pm 0,65$	$\pm 0,59$	$\pm 0,58$	$\pm 0,80$
Urämisch	3,89	2,84	2,36	2,97
(5)	$\pm 1,55$	$\pm 0,88$	$\pm 1,02$	$\pm 1,81$

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 α -Kg. wurde nach 40 min, NH_4Cl nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 21

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) und α -Ketoglutarat (0,3 mM) auf die Glutamin-konzentrationen im rezirkulierenden Perfusat von normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	40	45	50	52	54	56	58	60
Normal	0,14	0,15	0,17	0,20	0,23	0,26	0,27	0,29	0,31
(7)	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$
Urämisch	0,13	0,17	0,20	0,23	0,25	0,26	0,27	0,28	0,30
(5)	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$

- 70 -

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min, α KG. nach 40 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 22

Glutaminsyntheseraten (μ Mol/g Leber/Stunde) perfundierter Lebern von normalen und urämischen Ratten nach Ammoniakbelastung (1,5 mM) und zusätzlicher Gabe von α -Ketoglutarat (0,3 mM).

Zeit (Min)	50 - 56	56 - 60	60 - 70	70 - 80
Normal	6,45	5,55	2,26	1,22
(7)	$\pm 2,30$	$\pm 2,30$	$\pm 0,90$	$\pm 0,84$
Urämisch	5,15	2,69	3,40	0,25
(5)	$\pm 2,35$	$\pm 1,55$	$\pm 1,10$	$\pm 0,91$

- 71 -

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 α -Kg. wurde nach 40 min, NH_4Cl nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 23

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) und α -Ketoglutarat (0,3 mM) auf die Alaninkonzentrationen im rezirkulierenden Perfusat von normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	45	50	52	54	56	58	60
Normal	0,06	0,11	0,12	0,19	0,24	0,29	0,31	0,34
(15)	$\pm 0,01$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,04$	$\pm 0,05$
Urämisch	0,04	0,06	0,08	0,11	0,15	0,17	0,20	0,21
(11)	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,04$	$\pm 0,03$

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min, α -Kg. nach 40 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 24

Alaninproduktionsraten (μ Mol/g Leber/Stunde) perfundierter Lebern von normalen und urämischen Ratten nach Ammoniakbelastung (1,5 mM) und zusätzlicher Gabe von α -Ketoglutarat (0,3 mM).

Zeit (Min)	50 - 56	56 - 60	60 - 70	70 - 80
Normal (15)	11,98 $\pm$ 2,07	6,38 $\pm$ 2,57	3,80 $\pm$ 1,08	0,99 $\pm$ 0,82
Urämisch (11)	10,68 $\pm$ 6,25	2,57 $\pm$ 0,86	0,93 $\pm$ 1,52	1,97 $\pm$ 1,02

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 α -Kg. wurde nach 40 min, NH_4Cl nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 25

Das Konzentrationsgefälle von α -Ketoglutarat im rezirkulierenden Perfusat von normalen und urämischen Rattenlebern unter Zugabe von Ammoniak (1,5 mM) und α -Ketoglutarat (0,3 mM).

Zeit (Min)	30	40	45	50	52	54	56	58	60
Normal (16)	0,02	0,02	0,26	0,25	0,24	0,23	0,23	0,22	0,21
	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$
Urämisch (13)	0,01	0,01	0,27	0,23	0,22	0,21	0,20	0,19	0,17
	$\pm 0,00$	$\pm 0,00$	$\pm 0,03$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$

- 74 -

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min, α KG. nach 40 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 26

Sauerstoffaufnahme (μ g Atome Sauerstoff/g Leber/Stunde) perfundierter Lebern von normalen und urämischen Ratten nach Ammoniakbelastung (1,5 mM) und zusätzlicher Gabe von α -Ketoglutarat (0,3 mM).

Zeit (Min)	30	40	45	50	55	60	65	70	80	
Normal (13)	300 ± 15	310 ± 15	316 ± 15	342 ± 16	353 ± 16	352 ± 16	346 ± 15	339 ± 16	333 ± 16	1 75 1
Urämisch (12)	286 ± 16	293 ± 15	297 ± 15	332 ± 17	343 ± 16	341 ± 16	324 ± 15	314 ± 15	305 ± 12	

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 α -Kg. wurde nach 40 min, NH_4Cl nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 27

α -Ketoglutarateliminationsraten (μ Mol/g Leber/Stunde) perfundierter Lebern von normalen und urämischen Ratten nach Ammoniakbelastung (1,5 mM) und zusätzlicher Gabe von α -Ketoglutarat (0,3 mM).

Zeit (Min)	50 - 56	56 - 60	60 - 70	70 - 80
Normal	2,30	2,75	0,85	0,90
(16)	$\pm 1,16$	$\pm 0,83$	$\pm 0,36$	$\pm 0,22$
Urämisch	4,64	3,23	1,62	2,46
(13)	$\pm 1,52$	$\pm 0,59$	$\pm 0,66$	$\pm 0,86$

Angegeben sind die Mittelwerte $\pm$ S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 α -Kg. wurde nach 40 min, NH_4Cl nach 45 min Perfusion dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 28

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) und α -Ketoglutarat (0,3 mM) auf die Änderungen des Lactat/Pyruvat Quotienten im rezirkulierenden Perfusat von normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	40	45	50	52	54	56	58	60
Normal (16)	8,16 ± 0,60	8,08 ± 0,72	8,15 ± 0,71	11,47 ± 1,00	12,84 ± 1,08	11,82 ± 0,95	11,35 ± 0,86	9,80 ± 0,70	9,29 ± 0,88
Urämisch (13)	7,33 ± 0,85	7,37 ± 0,79	7,86 ± 0,97	10,56 ± 0,85	10,58 ± 0,93	9,73 ± 0,77	9,90 ± 0,76	9,68 ± 0,72	8,74 ± 0,72

Angegeben sind die Mittelwerte ± S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min, α KG. nach 40 min dem Perfusat zugegeben.

Tabelle 29

Einfluß einer einmaligen Ammoniakgabe (1,5 mM) und α -Ketoglutarat (0,3 mM) auf die Änderungen des β -Hydroxybutyrat/Acetoacetat Quotienten im rezirkulierenden Perfusat von normalen und urämischen Rattenlebern.

Zeit (Min)	30	40	45	50	52	54	56	58	60
Normal (16)	1,88 ± 0,45	1,75 ± 0,33	1,49 ± 0,19	1,68 ± 0,35	1,66 ± 0,39	1,53 ± 0,24	1,48 ± 0,16	1,52 ± 0,13	1,60 ± 0,17
Urämisch (13)	1,35 ± 0,33	1,28 ± 0,22	1,17 ± 0,25	0,90 ± 0,17	0,82 ± 0,14	0,85 ± 0,15	0,85 ± 0,16	0,97 ± 0,20	1,04 ± 0,20

- 78 -

Angegeben sind die Mittelwerte ± S.E.M., Zahl der Versuche in Parenthese.
 NH_4Cl wurde nach 45 min, α KG. nach 40 min dem Perfusat zugegeben.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahlberg, M.
Bergström, J.
Fürst, P.
Josephson, P.
Norée, L.-O.
Vinnars, E. Experience with essential amino acids in the treatment of patients with chronic uraemia. Infusionstherapie 2, 151, (1975).
2. Bauerdick, H.
Spellerberg, P.
Lamberts, B. Therapy with essential amino acids and their N-free analogues in severe renal failure. Int. Kongr. Nutrition in Renal Disease, 23.-25. May 1977, Würzburg.
3. Bergmeyer, H. Methoden der enzymatischen Analyse. In H. Bergmeyer, Verlag Chemie 1970, Weinheim.
4. Bergström, J.
Alvestrand, A.
Fürst, P.
Norée, L.-O.
Vinnars, E. Metabolic studies with essential amino acids and keto acids in renal failure. Int. Kongr. Nutrition in Renal Disease, 23.-25. May 1977, Würzburg.
5. Berl, S.
Tagakaki, G.
Clarke, D. D.
Waelisch, H. Metabolic compartments in vivo. Ammonia and glutamic acid in brain and liver. J. Biol. Chem., 8, 237, 1962.
6. Bessmann, S. P.
Bessmann, A. N. The cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with an hypothesis of the mechanism of hepatic coma. J. clin. Invest. 34, 622, (1955).
7. Böhles, H.
Harms, D.
Schmid, D.
Heid, D.
Fekl, W. Treatment of arginino succinic aciduria with ketoanalogues of essential aminoacids. Int. Kongr. Nutrition in Renal Disease, 23.-25. May 1977, Würzburg.
8. Brosnan, J. T.
Williamson, D. H. Mechanisms for the formation of alanine and aspartat in rat liver in vivo after administration of ammoniumchloride. Biochem. J. 138, 453, (1974).
9. Bücher, Th.
Klingenberg, M. Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation. Angew. Chem. 75, 800, (1963).

20. Dobbelstein, H. Zur Pathogenese der Urämie.
Internist 12, Heft 3, (1971).
21. Fröhlich, J. The effect of acute uraemia on
Schölmerich, J. gluconeogenesis in isolated per-
Hoppe-Seyler, G. fused rat liver.
Maier, K. P. Eur. J. clin. Invest. 4, 453, (1974).
Talke, H.
Schollmeyer, P.
Gerok, W.
22. Galloway, R. E. Serum pyruvate and lactate in
Morgan, J. M. uraemia.
Metabolism 13, 818, (1964).
23. Geerken, G. Die quantitative enzymatische De-
hydrierung von L(+)Laktat für die
Mikroanalyse.
Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 320,
180, (1960).
24. Gerok, W. Proteinsynthese und Aminosäure-
stoffwechsel bei Erkrankungen der
Leber.
Med. Klinik 66, 1720, (1971).
25. Giordano, C. Use of exogenous and endogenous
urea for proteinsynthesis in normal
and uraemic subjects.
J. Lab. clin. Med. 62, 231, (1963).
26. Giordano, C. Incorporation of urea ¹⁵N in amino
De Pascale, C. acids of patients with renal fai-
Palestrieri, C. lure on low protein diet.
Cittadini, A. Amer. L. clin. Nutr. 21, 394, (1968).
Crescenzi, A.
27. Giordano, C. Utilisation of ketoanalogues of
Philipps, M. E. valin and phenylalanine in health
De Pascale, C. and uraemia.
De Santo, N. G. Lancet 1, 178, (1972).
Fürst, P.
Brown, C. L.
Houghton, B. J.
Richards, P.
28. Gitelmann, H. J. Uraemic toxins and mineral meta-
bolism.
Arch. Intern. Med. 126, 793, (1970).

29. Glaze, R. P.
Morgan, M. J.
Morgan, R. E. Uncoupling of oxidativ phosphorylation by ultrafiltrate of uraemic serum.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125,
172, (1967).
30. Grunst, J.
Eisenburg, J.
Holl, J. Einfluß von Ornithin- α -Ketoglutarat auf die Ammoniakelimination am Modell der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber.
Neue Erkenntnisse des Ammoniakstoffwechsel, (Hrsg. Imler, Szam),
Baden-Baden G. Witzstrockverlag,
(1974).
31. Grunst, J.
Teilken, M.
Holl, J.
Schubert, G.
Eisenburg, J.
Dobbelstein, H. Stoffwechseländerungen nach Ammoniakbelastung an der perfundierten urämischen Rattenleber.
Verh. Dtsch. Ges. Inn- Med. 81,
958, (1975).
32. Grunst, J. Über den Anoxiezyklus bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber
Dissertation, (1967).
33. Grunst, J.
Löffler, I.
Teilken, M.
Holl, J. Einfluß von Ornithin und α -Ketoglutarat auf die Harnstoffbildung aus Ammoniak bei normalen und urämischen Rattenlebern.
Aminosäuren, Ammoniak u. hepatische Enzephalopathie. Ed.: F. Wewalka,
Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart,
(1978).
34. Grunst, J. Ammoniakkonzentrationen im Pfortader- und venösen Blut.
In Vorbereitung.
35. Hawkins, A. R.
Miller, L. A.
Nielsen, R. C.
Veech, R. C. The acute action of ammonia on rat brain metabolism in vivo.
Biochem. J. 134, 1001, (1973).
36. Heintz, R. Zellstoffwechsel bei chronischer Niereninsuffizienz.
Dissertation.

37. Held, E. Plasmaamino­säuren bei chronischer
Winkelmann, E. Niereninsuffizienz.
Finke, K. Klin. Wschr. 52, 974, (1974).
von Dehn, H.
Seyfert, G.
Gurland, H.
38. Hindfelt, B. Cerebral effects of acute ammonia-
Siesjö, B. K. intoxication.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 365,
(1972).
39. Hodler, J. Pathophysiologie und Pathobiochemie
Hunkeler, H. in der Urämie.
Med. Klinik 71, 77, (1976).
40. Hohorst, H. J. Steadystate equilibria of some
Kreutz, F. H. DPN-linked reactions and the oxida-
Rein, M. tion/reduction state of DPN/DPNH
system.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 4,
159, (1961).
41. Holm, E. Behandlung mit Aminosäuren bei he-
patischer Enzephalopathie.
Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart,
(1976).
42. Hsia, Y. E. Inherited hyperammonaemic syndromes.
Gastroenterology 67, 347, (1974).
43. James, I. M. Effect of ornithin- α -oxoglutarate
Hamlyn, A. N. on brain metabolism in patients
Brant, P. C. with chronic liver disease.
Hildrew, P. J. Neurol. Neurochem. Psychiat. 38,
214, (1975).
44. John, H. D. Biochemische Studien und Grund-
lagen der Rocmalinetherapie.
Therapiewoche 17, 35, (1967).
45. Jones, M. R. Valine metabolism in normal and
Kopple, J. D. chronically uraemic man.
Int. Congr. Nutrition in Renal Di-
sease, 23.-25. May 1977, Würzburg.
46. Josephson, B. N^{15} studies on metabolism of urea,
Bergström, J. amino acids and protein in uraemic
Fürst, P. patients.
Norée, L.-O. Uremia, Thieme Verlag Stuttgart,
144, (1972).

47. Sangduk, K.
Woon ki, P.
Cohen, P. P. Ammoniaintoxication in rats:
Protecting by N-carbamyl-L-glutamat
plus arginin.
Proc. Nat. Acad. Scand. 69, 3530,
(1972).
48. Kirsten, E. C.
Gerez, C.
Kirsten, R. Eine enzymatische Mikrobestimmung
des Ammoniaks, geeignet für Extrak-
te aus tierischen Gewebe und Flüs-
sigkeiten.
Biochem. Z. 337, 312, (1963).
49. Klingenberg, M.
von Häfen, H. Wege des Wasserstoffs in den Mito-
chondrien.
Biochem. Z. 337, 120, (1963).
50. Kramer, J. W.
Freedland, R. A. Possible rate-limiting factors in
urea synthesis by the perfused rat
liver.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 141,
833, (1972).
51. Krebs, H.
Henseleit Untersuchungen über die Harnstoff-
bildung im Tierkörper.
Z. Physiol. Chem. 210, 1932.
52. Krebs, H. A. Referat.
53. Lamberts, B.
Spellenberg, P.
Bauerdick, H.
Ochs, H. G.
Heintz, R. In vitro effects of aminoacids-
ketoanalogues in chronic uraemia.
Int. Congr. Nutrition in Renal Di-
sease, 23.-25. May 1977, Würzburg.
54. Leber, H. W.
Schütterle, G. Oxidative drug metabolism in liver
macroosomes from uraemic rats.
Kidney int. 2, 152, (1972).
55. Leinweber, W.
Goldberg, P.
Erb, W. Ammoniak und Fettstoffwechsel unter
Di-L(+) Ornithin- α -Ketoglutarat
bei Patienten mit Leberzirrhose und
gleichzeitiger Hyperammonämie.
Med. Klin. 71, 1043, (1976).
56. Maier, K. P.
Hoppe-Seyler, G.
Talke, H.
Fröhlich, J.
Schollmeyer, P.
Gerok, W. Enzymatic and metabolic studies on
carbohydrate and amonoacid metabo-
lism in rat liver during acute
uraemia.
Eur. J. clin. Invest. 3, 201, (1976)

57. Mc Khann, G. M. Tower, T. B. Ammoniatotoxicity and cerebral oxidativ metabolism. Amer. J. Physiol. 200, 420, (1961).
58. Miertsch, H. J. Róka, L. Ammoniakverwertung und Harnstoffsynthese der isoliert perfundierten Rattenleber. Z. klin. Chem. klin. Biochem. 10, (1972).
59. Milner, J. A. Visek, W. J. Urinary metabolites characteristic at urea cycle aminoacid deficiency. Metabolism 24, (1975).
60. Morrison, A. B. Experimental chronic renal insufficiency. Meth. Arch. Exp. Pathol. 1, 455, (1966).
61. Müting, D. Eiweißstoffwechsel und Entgiftung bei Leberinsuffizienz. Referat, Homburg/Saar.
62. Nance, F. C. Kaufmann, H. J. Kline, D. G. Role of the urea in the hyperammonia in germ-free Eck fistula dogs. Gastroent. 66, 80, (1974).
63. Neuhäuser, M. Ulm, A. Leber, H. W. Influence of essential amino acids and keto acids on protein metabolism and anemia of patients on intermittent haemodialysis. Int. Kongr. Nutrition in Renal Disease, 23.-25. May, Würzburg.
64. Palmer, T. Oberholzer, V. G. Levine, B. Aminoacid levels in patients with hyperammonemia and argininossuccinic aciduria. Clin. Chimica Acta 52, 333, (1974).
65. Parrila, R. Goodman, M. N. Nitrogen metabolism in the isolated perfused rat liver. Biochem. J. 138, 341, (1974).
66. Pausch, J. Gerok, W. Biochemische und pathophysiologische Aspekte der Hyperammonämie. Klin. Wschr. 55, 97, (1977).
67. Prior, R. L. Visek, W. J. Effects of the urea hydrolysis on tissue metabolite concentration in rats. Americ. J. Physiol. 223, Nr. 5, (1972).

68. Rajagopalan, K. V.
Fridovich, J.
Handler, P. Competitive inhibition of enzyme activity by urea.
J. Biol. Chem. 236, II, (1961).
69. Renner, D. Zur biochemischen Pathogenese der urämischen Vergiftung.
Med. Welt 24, Heft 1, (1973).
70. Richards, P.
Brown, C. L.
Houghton, P. J.
Thompson, E. E. Synthesis of phenylalanine and valine by healthy and uremic men.
Lancet 2, 128, (1971).
71. Richards, P.
Metcalf-Gibson, A.
Ward, E. E.
Wrong, O. M.
Houghton, P. J. Utilisation of ammonianitrogen for proteinsynthesis in men and the effect of protein restriction and uremia.
Lancet 2, 845, (1967).
72. Saheki Takeyori
Katunuma Nobuhiko Analysis of regulatory factors for urea synthesis by isolated perfused rat liver.
J. Biochem. 77, 659, (1975).
73. Schnittger
Scholz, R.
Bücher, Th.
Lübbers Comparative flourometric studies in vivo and on isolated perfused hemoglobinfree liver.
Biochem. Z. 341, 334, (1965).
74. Scholz, R.
Bücher, Th. Hemoglobinfree perfusion of rat liver, control of energy metabolism.
Ed. Chance, B. Acad. Pr. Page 393, (1965).
75. Scholz, R. Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber.
In: W. Staib, R. Scholz (Hrsg.): Stoffwechsel der perfundierten Leber Springerverlag Berlin - Heidelberg - New York 1968.
76. Scholz, R. Leberperfusion.
3. Konf. Ges. Biol. Chemie, Östrich 1967.
77. Scholz, R.
Schwarz, F.
Bücher, Th. Barbiturate und energieliefernder Stoffwechsel in der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber.
Z. klin. Chemie 4, (1966).

78. Selleck, B. H.
Cohen, J. L. Specific location of α -ketoglutarate uptake to dog kidney and liver in vivo.
Americ. J. Physiol. 208, 24, (1969).
79. Sies, H.
Häussinger, D.
Grosskopf, M. Mitochondrial nicotinamid-nucleotide systems: Ammonium chloride responses and associated metabolic transitions in hemoglobinfree perfused rat liver.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 305, (1974).
80. Sies, H.
Summer, K. H.
Bücher, Th. A process requiring mitochondrial NADPH: Urea formation from ammonia.
Febs. Letters 54, 274, (1975).
81. Sies, H.
Akerboom, T. P. M.
Tager, J. M. Mitochondrial and cytosolic NADPH systems and isocitrate dehydrogenase. Indicator metabolites during urogenesis from ammonia in isolated rat hepatocytes.
Eur. J. Biochem. 72, 301, (1977).
82. Simpson, D. P.
Sherrad, D. J. Regulation of glutamine metabolism in vivo by bicarbonate ions and pH.
J. clin. Invest. 48, 1088, (1969).
83. Spellerberg, P.
Lamberts, B.
Bauerdick, H.
Ochs, H. G.
Heintz, R. Die Wirkung von Aminosäuren und deren Ketoanaloge auf Harnstoff und Ketonkörperbildung in Rattenleberschnitten bei chronischer Urämie.
83. Tagung Dtsch. Ges. Inn. Med. 17.-21. April 1977, Wiesbaden.
84. Stein, J. M.
Cohen, B. D.
Kornhauser, R. S. Guanidinosuccinic acid in renal failure, experimental acotemia and inborn errors of the urea cycle.
New Engl. J. Med. 280, 926, (1969).
85. Teilken, M. Dissertation in Vorbereitung.
86. Teschan, P. E. On the pathogenesis of uremia.
Americ. J. Med. 48, 671, (1970).
87. Thölen, H. Neuere Erkenntnisse zur Pathogenese und Therapie des Leberkomas.
Aus: Erkenntnisse der Inneren Med. und Kinderheilkunde, Bd. 21, 48-97, Springer-Verlag Berlin 1964.

88. Vlaho, M. Urea synthesis and enzyme of urea
Knuetgen, W. cycle in experimental acute and
Sieberth, H. G. chronic uremia.
Int. Congr. Nutrition in Renal Di-
sease, 23.-25. May 1977, Würzburg.
89. Walser, M. Formation of essential aminoacids
Lund, P. from their ketoanalogues by per-
Rudermann, N. fused liver and muscle.
Coulter, A. W. Clin. Research 20, 634.
Krebs, H. A.
90. Warburg, O. Chemische Konstitution von Fer-
menten.
Ergebn. Enzymforschung 7, 210,
(1968).
91. Wieland, O. H. Regulation of pyruvate dehydrogenase
Portenhauser, R. interconversion in rat liver mito-
chondria as related to the phos-
phorilation state of intramitochon-
drial adenosine nucleotides.
Eur. J. Biochem. 45, (1974).
92. Williamson, D. H. The redox state of free nicotin-
Lund, P. amide-adenine dinucleotide in the
Krebs, H. A. cytoplasm and mitochondria of rat
liver.
Biochem. J. 103, 514, (1967).
93. Williamson, D. H. Encymic determination of D(-)- β -
Mellanby, J. hydroxybutyriacid in blood.
Krebs, H. A. Biochem. Z. 82, 90, (1962).

Abkürzungen.

alpha-KG	=	alpha-Ketoglutarat
Acac	=	Acetoacetat
ADP	=	Adenosindiphosphat
ATP	=	Adenosintriphosphat
β -Hob	=	β -Hydroxybutyrat
β -HBDH	=	β -Hydroxybutyratdehydrogenase
EDTA	=	Aethylen-diamin-tetraacetat
GBS	=	Guanidinbernsteinsäure
GLDH	=	Glutamatdehydrogenase
GOT	=	Glutamatoxalacetattransaminase
GPT	=	Glutamat-Pyruvattransaminase
LDH	=	Lactatdehydrogenase
L/P	=	Lactat/Pyruvat
NAD(P)	=	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-(phosphat)
NH_4Cl	=	Ammoniumchlorid
PDH	=	Pyruvatdehydrogenase
TRA	=	Triaethanolamin
TRIS	=	Tris-hydroxy-methyl-amino-methan

An dieser Stelle möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. J. Grunst für die freundliche Überlassung des Themas und seine hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Dank auch Frau Dyck, die freundlicherweise die Arbeit für mich mit der Maschine schrieb.

Lebenslauf.

Ich, Ludwig Löffler, wurde am 7.3.51 in München als erstes Kind des Landwirts Ludwig Löffler und dessen Frau Margarethe geb. Ritzer geboren. Ich habe noch drei Schwestern. Aufgewachsen bin ich in Puppling bei Wolfratshausen, besuchte in Wolfratshausen vier Jahre die Volksschule und ging dann sechs Jahre ins Gymnasium nach Kloster Schäftlarn. 1968 wechselte ich auf das Gymnasium nach Icking um und erlangte dort 1971 das Zeugnis der Reife. Im Herbst des selben Jahres fing ich an, in München Medizin zu studieren und legte im Herbst 72 erfolgreich das Vorphysikum, im Herbst 73 das Physikum ab. Einen zweimonatigen Krankenpflegedienst absolvierte ich auf der Chirurgie im Krankenhaus Martha-Maria in München-Solln. Im Sommer 74 begann ich mit den tierexperimentellen Arbeiten zu meiner vorliegenden Dissertationsarbeit über den Ammoniakstoffwechsel der Rattenleber in der chronischen Urämie. Im Herbst 74 legte ich den ersten Teil des Staatsexamens, im Herbst 76 den zweiten Teil erfolgreich ab. Dazwischen arbeitete ich noch zwei Monate im Rahmen der Famulatur auf verschiedenen Abteilungen des Städtischen Gesundheitsamtes München. Im praktischen Jahr arbeitete ich vier Monate auf der Chirurgie im Schwabinger Krankenhaus, vier Monate in der Orthopädie bei Prof. Witt und vier Monate in der Gastroenterologie bei Prof. Eisenburg in Großhadern. Am 21.10.77 bestand ich den dritten Teil des Staatsexamens, am 27.10.77 erhielt ich die Approbation als Arzt. Seit 1.1.78 arbeite ich als Assistenzarzt in der Chirurgie im Kreiskrankenhaus Tegernsee.

